



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS: PASSADO,  
PRESENTE E FUTURO**

Trabalho submetido por  
**Madalena Sousa Carnall**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2014**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS: PASSADO, PRESENTE E FUTURO**

Trabalho submetido por  
**Madalena Sousa Carnall**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Profª Doutora Perpétua Gomes**

**Outubro de 2014**



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família, pelo incentivo nos momentos críticos e apoio ao longo de todo o percurso académico.

Aos meus professores por todo o carinho e dedicação durante todos estes anos; em especial à minha orientadora, a professora Perpétua Gomes, que me ajudou e orientou bastante, sem ela não teria uma boa dissertação.

Ao meu namorado, Francisco, que ajudou na aquisição de artigos científicos e na formatação da dissertação. Para além de todo o apoio, carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

À minha amiga, Rita Margarida, que me deu um enorme apoio durante a escrita da dissertação.

Aos meus colegas, com destaque para os da turma 1, que me acompanharam desde do primeiro dia de aulas.

A todos os que directa ou indirectamente contribuíram para me ajudar e apoiar ao longo do percurso académico e no decorrer desta dissertação, tornando-me numa melhor pessoa.



## Resumo

Os anticorpos são uma das defesas mais importantes do nosso organismo.

Desde 1972, que foi possível produzir anticorpos monoclonais (*mAbs*) através de várias técnicas, como a técnica do hibridoma, a técnica do rato transgénico e as *display technologies*.

Depois do desenvolvimento destas três grandes técnicas, a indústria tem-se focado no aperfeiçoamento, no aumento da produtividade, e na engenharia celular em modificações das características do produto final e na criação e no desenvolvimento de fragmentos de anticorpos monoclonais. Os fragmentos de anticorpos monoclonais são moléculas terapêuticas de baixo peso molecular, o que lhes permite penetrar mais facilmente no alvo terapêutico. Assim, é possível fundir estas moléculas com outras moléculas, conduzindo-as até ao alvo.

A produção em larga escala dos *mAbs* pode ser dividida em três processos: o processo *upstream*, o processo de fermentação/produção da cultura de células e o processo *downstream*.

Depois de criados, desenvolvidos e produzidos, os anticorpos monoclonais são submetidos a ensaios clínicos com o objectivo de virem a ser aprovados para utilização clínica. Os *mAbs* são utilizados em muitas áreas, sendo a de maior importância a medicina, e são utilizados em diagnóstico e terapêutica, em várias doenças, como por exemplo, auto-imunes, cardiovasculares, infecciosas e cancro.

Os primeiros *mAbs* perderam e outros estão quase a perder as suas patentes, tornando possível a produção de “genéricos”, os biossimilares, que serão comercializados a preços mais baixos. Assim, as empresas farmacêuticas têm vindo a apostar no desenvolvimento de biossimilares, pois criam concorrência no mercado, através da redução do preço.

Os anticorpos monoclonais continuam e continuarão, a ser objecto de estudo nos próximos anos.

**Palavras-chave:** Anticorpos monoclonais; hibridoma; rato transgénico; *display technologies*





## Abstract

Antibodies are one of the most important defences of our organism.

Since 1972, it was possible to produce monoclonal antibodies (*mAbs*) through various techniques, such as the hybridoma technique and the technique of the transgenic mouse and the display technologies.

After the development of these three great techniques, the industry has focused on perfecting, in increasing productivity, and in cellular engineering in modifications of the characteristics of the final product and the creation and development of monoclonal antibody fragments. The fragments of monoclonal antibodies are therapeutic molecules of low molecular weight, allowing them to penetrate more easily in the therapeutic target. Thus, it is possible to merge these molecules with other molecules and leading them to the target.

The large-scale production of *mAbs* can be divided into three processes: the *upstream* process, the process of fermentation/cell culture production and *downstream* process.

Once created, developed and produced, monoclonal antibodies are undergoing clinical trials in order to be approved for clinical use. The *mAbs* are used in many areas, the most important is the medicine and they are used in diagnosis and therapy, in various diseases such as autoimmune, cardiovascular, infectious diseases and cancer.

Some *mAbs* lost and others are about to lose their patents, that makes it possible to produce biosimilars, which will be marketed at the lowest prices. Thus, pharmaceutical companies have been focusing on the development of biosimilar, because they create competition in the market, by reducing the price.

Monoclonal antibodies are continuing and they will continue, to be studied in the next few years.

**Keywords:** Monoclonal Antibody, hybridoma, transgenic mouse, display technologies



# Índice geral

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE GERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1. ENQUADRAMENTO GERAL .....	17
1.2. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO.....	21
<b>2. TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....</b>	<b>23</b>
2.1. TÉCNICA DO HIBRIDOMA.....	23
2.2. TÉCNICA DO RATO TRANSGÉNICO.....	26
2.3. <i>DISPLAY TECHNOLOGIES</i> .....	28
2.3.1. <i>Phage display</i> .....	28
2.3.2. <i>Ribosome display</i> .....	30
2.3.3. <i>Cell display</i> .....	30
2.3.4. <i>Bibliotecas criadas a partir das display technologies</i> .....	32
2.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	34
2.4.1. <i>Cultura de células/Linhas celulares</i> .....	35
2.4.2. <i>Sistemas de produção</i> .....	36
2.4.3. <i>Métodos de operação</i> .....	39
2.4.4. <i>Processos de monitorização</i> .....	41
2.4.5. <i>Processo upstream</i> .....	41
2.4.6. <i>Processos downstream</i> .....	44
2.5. ENGENHARIA CELULAR PARA AUMENTAR A PRODUTIVIDADE OU MODIFICAR AS CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO .....	48
2.5.1. <i>Engenharia celular multivalente, bi-específica e fragmentos bi-funcionais</i> .....	50
<b>3. ANTICORPOS MONOCLONAIS.....</b>	<b>53</b>
3.1. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS .....	53
3.2. BIOSSIMILARES .....	55
3.3. SITUAÇÃO ECONÓMICA E PATENTES DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS E BIOSSIMILARES ..	57
3.4. ANTICORPOS MONOCLONAIS EM PORTUGAL .....	59
<b>4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS – FUTURO .....</b>	<b>61</b>
4.1. PRODUÇÃO .....	61
4.2. BIOSSIMILARES .....	62
4.3. FUTUROS ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	63
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>69</b>



## Índice de figuras

FIGURA 1 – ESTRUTURA DA IGG E AS SUAS SUBCLASSES .....	19
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA IGG, <i>FAB</i> E <i>FC</i> .....	20
FIGURA 3 – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS. ....	24
FIGURA 4 – TIPOS DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	25
FIGURA 5 – SISTEMAS UTILIZADOS EM LABORATÓRIO NA CULTURA ADERENTE .....	38
FIGURA 6 – MÉTODOS DE OPERAÇÃO. ....	40
FIGURA 7 – PROCESSO <i>UPSTREAM</i> (1) E PROCESSO DE PRODUÇÃO/FERMENTAÇÃO DE CÉLULAS (2 E 3) .....	43
FIGURA 8 – PROCESSO <i>DOWNSTREAM</i> – CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE COM A PROTEÍNA A E <i>POLISHING</i> CHROMATOGRAPHY. ....	46
FIGURA 9 – PROCESSO <i>DOWNSTREAM</i> – FILTRAÇÃO VIRAL; <i>ULTRAFILTRATION</i> E <i>DIAFILTRATION</i> . ....	47
FIGURA 10 – PERCENTAGENS DAS VENDAS DE ANTICORPOS MONOCLONAIS, EM CADA ÁREA, EM 2010. ....	57



## Índice de tabelas

TABELA 1 – ANTICORPOS MONOCLONAIS E A SUA UTILIZAÇÃO CLÍNICA.....	54
TABELA 2 – PRODUTOS BIOFARMACÊUTICOS DE REFERÊNCIA COM PATENTES A EXPIRAR. ....	59
TABELA 3 – ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS.....	63
TABELA 4 – ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS. ....	64





## Abreviaturas

Ac	Anticorpo
ADCC	Anticorpos que Dependem das Células que produzem Citotoxicidade
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Antigénio
Apex	<i>Anchored Periplasmic Expressions</i>
ARN	Ácido Ribonucléico
CDAF	<i>Chemically Defined, Animal Componente Free</i> – quimicamente definido por animal de componente livre
CDC	Complexos Dependentes de Citotoxicidade
CDR	<i>Complementarity Determing Region</i> – região de determinação complementar
CEX	<i>Cation Exchange Chromatography</i> – cromatografia por troca de catiões
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> – células de ovário de hamster chinês
dAbs	Anticorpos Dominantes
DHFR	Di-hidrofolato Redutase
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays</i> <sup>o</sup>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Fab	<i>Antigen Binding Fragment</i> – fragmento de ligação ao antigénio
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>Constant Fragment</i> – fragmento constante
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
Fr	<i>Framework Region</i>
GS	Glutamina Sintetase
HACA	<i>Human Anti-chimeric Antibodies</i> – anticorpos humanos anti-quiméricos
HAMA	<i>Human Anti-mouse Antibodies</i> – anticorpos humanos anti-murinos
HAT	Hipoxentina–Aminopterina.Timidina
HC	<i>Heavy Chain</i> – cadeia pesada
Ig	Imunoglobulina
LC	<i>Light Chain</i> – cadeia leve
mAb(s)	Anticorpo(s) Monoclonal (ais)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – reacção em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
Qp	Taxa de Produção Específica
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> – transcriptase reversa da reacção em cadeia da polimerase
scFv	<i>Single-chain Variable Fragments</i> – cadeias únicas de fragmentos variáveis
STR	<i>Stirred Tank Bioreactor</i> – biorreator em tanque agitado



# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento geral

Os anticorpos (Ac) também conhecidos por imunoglobulinas, são glicoproteínas que circulam no sangue e na linfa, são produzidos pelos linfócitos B, como resposta à presença estranha de antígenos. Os anticorpos reconhecem certas proteínas existentes nas células, estranhas ao organismo ou não, denominadas de antígenos (Ag). Cada Ac possui uma estrutura única que permite a sua ligação específica a um determinado Ag. O Ag tem vários epítomos, um epítomo é a região que o Ac reconhece e posteriormente se liga.

Os anticorpos são considerados uma das defesas mais importantes do nosso organismo contra as doenças.

Devido à sua importância cedo se percebeu que estas moléculas podiam ser utilizadas com diversos fins começando a ser desenvolvidas diferentes estratégias para produção de Acs.

Além de serem moléculas terapêuticas, são também utilizados como ferramentas biológicas em várias áreas pois são capazes de executar variadas funções, tais como:

- (a) Permitir visualizar expressões proteicas;
- (b) Analisar vias de sinalização;
- (c) Estudar interações entre os receptores e os ligantes;
- (d) Facilitar a imunoprecipitação;
- (e) Expressar clonagem directamente;
- (f) Diagnosticar, porque são o elemento biológico ideal para reconhecer os antígenos;
- (g) Serem utilizados em plataformas analíticas, como *Western blotting*, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*), PCR (*polymerase chain reaction*) entre outras.

(Mesci e Carlyle, 2007; Aires da Silva, Corte-Real, e Goncalves, 2008; Cervino, Weber, Knopp, e Niessner, 2008; Ayyar, Arora, Murphy, e O’Kennedy, 2012; Dostalek, Gardner, Gurbaxani, Rose, e Chetty, 2013; Adams e Sidhu, 2014)

Os anticorpos utilizados com fins terapêuticos têm como objectivo eliminar ou neutralizar o organismo patogénico ou as células doentes, como é o caso das células cancerígenas. Para alcançarem o seu objectivo os anticorpos têm vários mecanismos e em muitos dos casos, a ligação directa do anticorpo ao agente patogénico bloqueia directamente a sua actividade, tornando os anticorpos muito eficazes. Noutros casos o tratamento precisa de uma resposta imune generalizada e, conseqüentemente, os anticorpos têm de aumentar as suas funções específicas, tais como, os anticorpos dependentes das células que produzem citotóxicos (ADCC) e os complexos dependentes de citotoxicidade (CDC) (Aires da Silva et al., 2008).

Em resposta aos ADCC, os anticorpos ligam-se aos antígenos das células alvo e a região *Fc* (*constant fragment*) dominante do anticorpo ocupa os receptores *Fc* na superfície das células receptoras, de que são exemplos, os macrófagos e as células *killer*. Posteriormente estas células realizam a fagocitose e lise das células alvo. Estas funções contribuem para a eficácia terapêutica dos anticorpos monoclonais (*mAbs*), como acontece, por exemplo nas células tumorais (Aires da Silva et al., 2008).

Os anticorpos monoclonais são, então, a segunda maior classe terapêutica de fármacos, sendo que a primeira são as vacinas (Aires da Silva et al., 2008).

A estrutura geral dos anticorpos foi estabelecida em 1970 por Porter e Edelman, o que lhes valeu o Prémio Nobel da Medicina em 1972 (Dostalek et al., 2013).

As imunoglobulinas (Ig) humanas estão distribuídas em cinco subclasses:

- (a) IgA;
- (b) IgD;
- (c) IgE;
- (d) IgG;
- (e) IgM.

O que as diferencia é a cadeia pesada pois têm todas a mesma cadeia leve. A mais prevalente no nosso organismo é a IgG, esta pode ser, ainda, dividida em subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que variam na sua estrutura interna e antigénica. (Figura 1) (Aires da Silva et al., 2008; Ayyar et al., 2012; Kyriakopoulos e Kontoravdi, 2012; Dostalek et al., 2013).

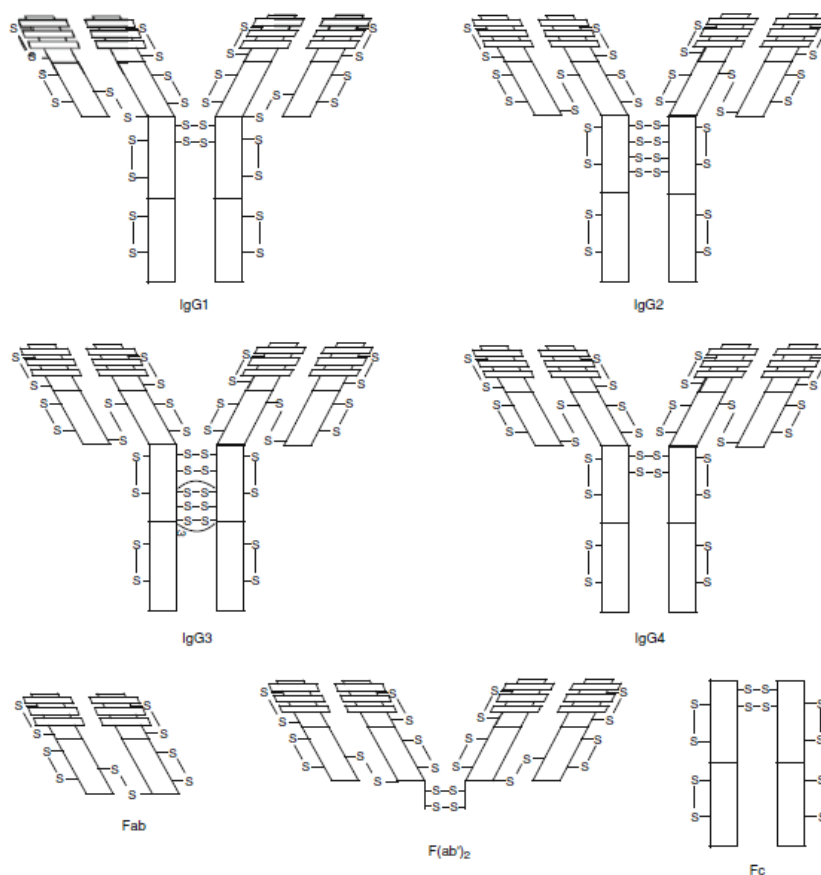


Figura 1 – Estrutura da IgG e as suas subclasses  
Adaptado de (Dostalek et al., 2013)

A estrutura da IgG (Figura 1 e Figura 2) é composta por duas cadeias leves (L – *light chain*) e duas cadeias pesadas (H – *heavy chains*) que se encontram ligadas por um polipéptido e por várias pontes de dissulfato, formando um Y. Na estrutura da IgG podemos distinguir duas regiões, a região *Fab* (*antigen binding fragment*) e a região constante *Fc* (*constant fragment*) (Figura 2). A região *Fab* tem como função a ligação com o antígeno, enquanto que a região *Fc* tem um papel indirecto na ligação com o antígeno, pois, para além de se poder ligar completamente, também se liga às células receptoras nos macrófagos e nos monócitos. Esta região serve, ainda, para distinguir as classes dos anticorpos.

A sequência de aminoácidos nas regiões variáveis varia de anticorpo para anticorpo. Cada região variável (pertencentes à região *Fab*) contém três regiões híper variáveis (HV), que estão interligadas por quatro *framework regions* (*Fr*). Os *Fr* mantêm a estrutura do anticorpo, sendo os “ossos” do anticorpo. As regiões variáveis têm a capacidade de identificar

e de se ligarem aos epítomos do antígeno. A ligação é constituída por seis *loops*, três de cadeias pesadas e três de cadeias leves. Os *loops* de cada cadeia são designados de CDR (*complementary determining regions*) (Aires da Silva et al., 2008; Ayyar et al., 2012; Kyriakopoulos e Kontoravdi, 2012; Dostalek et al., 2013).

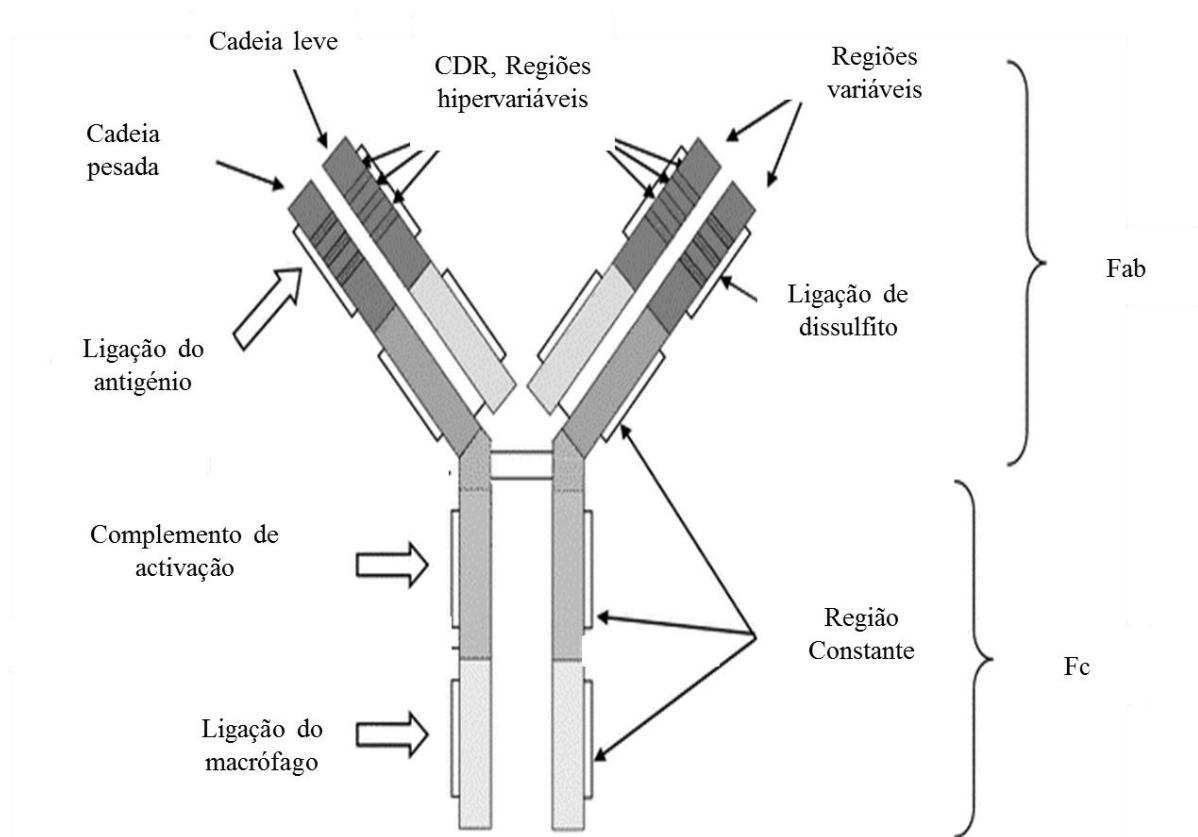


Figura 2 – Estrutura da IgG, Fab e Fc  
Adaptado de (Ho, McLaughlin, Cue, e Dunn, 2010)

Existem três tipos de anticorpos (Ayyar et al., 2012):

- (a) Policlonal – anticorpos produzidos por vários linfócitos B num hospedeiro. Estes tipos de Ac constituem uma mistura heterogénea que reconhece vários epítomos ao mesmo tempo;
- (b) Monoclonal – é produzido apenas um anticorpo, sendo este específico para um epítopo;
- (c) Recombinante e/ou fragmentos de anticorpo – produzido através de técnicas moleculares em laboratório. Os fragmentos mais comuns são *scFv* (*single chain fragment variable*) e *Fab* (*antigen binding fragment*).

Os *scFv* contêm uma variedade de moléculas com diferentes funcionalidades e têm como vantagem o seu baixo peso molecular. Isto, facilita a penetração em tecidos ou até mesmo em tumores, sendo esta a característica que os torna uma “arma” poderosa na imunoterapia. Estas moléculas podem também fundir-se com outras moléculas, conduzindo-as até aos alvos (Malpiedi, Díaz, Nerli, e Pessoa, 2013).

## **1.2. Objectivos da dissertação**

- 1) Saber o que há sobre anticorpos monoclonais e as suas aplicações;
- 2) Conhecer as técnicas de produção de anticorpos monoclonais;
- 3) Conhecer a situação económica dos anticorpos monoclonais;
- 4) Conhecer o panorama em Portugal.





## 2. Técnicas de produção de anticorpos monoclonais

A produção de anticorpos monoclonais iniciou-se com a técnica do hibridoma.

À medida que a biotecnologia avançou, foram criadas novas técnicas e novos métodos de produção de *mAbs*. Foram exemplos de novas técnicas o rato transgénico e as *display technologies*.

Normalmente os *mAbs* são produzidos em culturas de células de mamíferos, no entanto, existem alternativas menos complexas e mais baratas para a produção dos anticorpos ou de fragmentos, como por exemplo as bactérias (*E.coli*) e os fungos (*Aspergillus*). Outra possibilidade é a utilização de sistemas transgénicos (Birch e Racher, 2006).

Assim, na produção de fragmentos de anticorpos, as bactérias mais especificamente a *E.coli*, ganharam uma importância considerável (Jain e Kumar, 2008).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas novas técnicas e novos métodos de *screening* para explorar e desenvolver anticorpos humanos e humanizados com grandes afinidades. A *phage display* e a o rato transgénico são métodos que expressam os genes dos anticorpos humanos, são actualmente duas das tecnologias melhor desenvolvidas, tendo plataformas que são utilizadas para identificar o número de crescimento dos anticorpos em ensaios clínicos (Aires da Silva et al., 2008; Doerner, Rhiel, Zielonka, e Kolmar, 2014).

Nos subcapítulos que se seguem, vai ser feita uma abordagem histórica de cada técnica, começando pela técnica do hibridoma, seguida da técnica do rato transgénico e, por fim, as *display technologies*.

### 2.1. Técnica do hibridoma

A técnica do hibridoma consiste na fusão de um linfócito B activado com uma célula de mieloma (Ling et al., 2003). Uma vez que o linfócito B é mortal e tem uma síntese de nucleótidos normal, a célula do mieloma é imortal mas tem uma síntese de nucleótidos deficiente, estas podem-se fundir, por exemplo, no meio HAT (hipoxantina–aminopterin–timidina) originando o hibridoma, sendo este imortal e com uma síntese de nucleótidos normal (Figura 3) (Hairul Bahara et al., 2013; Harman, Giles–Komar, e Ryczyn, 2014).

Em 1972, Porter e Edelman descobriram a estrutura dos anticorpos. Em 1975, Köhler e Milstein aproveitaram a descoberta anterior e desenvolveram a técnica do hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais em larga escala (Ling et al., 2003).

Esta técnica consistia em injectar o hibridoma, depois de desenvolvido *in vitro*, na cavidade peritoneal dos animais, com o objectivo de produzir o anticorpo numa quantidade considerável. Quando atingia a quantidade desejada o anticorpo era recolhido a partir do líquido ascítico. Este método ficou conhecido como o método de ascite e, foi um dos métodos mais utilizados para a produção de *mAbs* em larga escala, pois de entre métodos *in vitro* já existentes era o mais rentável (Peterson, 1972; Marx, 1998).

No entanto, devido às leis da protecção animal, o método de ascite foi restringido em vários países da União Europeia e mais tarde nos Estados Unidos da América, voltando a produzir através de métodos *in vitro*. (Falkenberg, 1998).

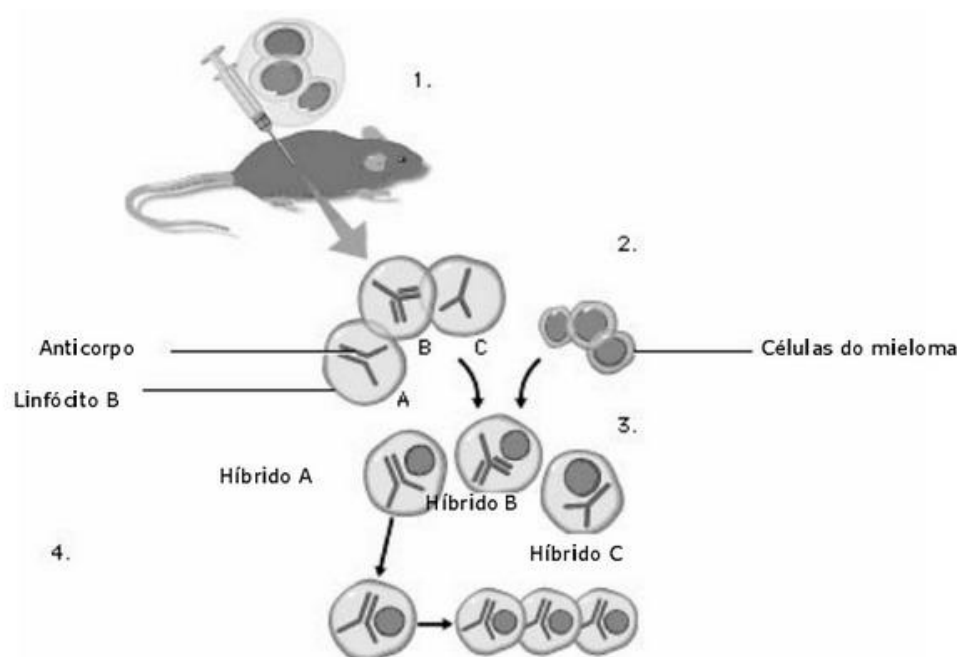


Figura 3 – Produção de anticorpos monoclonais.

1) Linfócitos B retirados do rato, 2) Células do mieloma, 3) Fusão dos linfócitos B com as células do mieloma, em meio especial, 4) Anticorpos monoclonais produzidos.

Adaptado de ([www.biomedicinapadrao.com](http://www.biomedicinapadrao.com)/[www.bio.davidson.edu](http://www.bio.davidson.edu))

A técnica do hibridoma permitiu a produção de um único anticorpo específico em quantidades consideráveis, o que tornou possível usá-lo como fármaco. Desde então muitos

*mAbs* têm sido produzidos e, conseqüentemente, foram criadas nomenclaturas (Ling et al., 2003; Aires da Silva et al., 2008; Dostalek et al., 2013).

A nomenclatura dos diferentes tipos de anticorpos monoclonais é a seguinte:

- Anticorpo monoclonal murino – omab;
- Anticorpo monoclonal quimérico – ximab; corresponde a 33% de rato e 67% humano;
- Anticorpo monoclonal humanizado – zumab; corresponde entre 5 a 10% de rato e 90 a 95% humano;
- Anticorpo monoclonal humano – umab;

(Figura 4) (Green, 1999; Kellermann e Green, 2002; Dostalek et al., 2013; Elvin, Couston, e van der Walle, 2013)

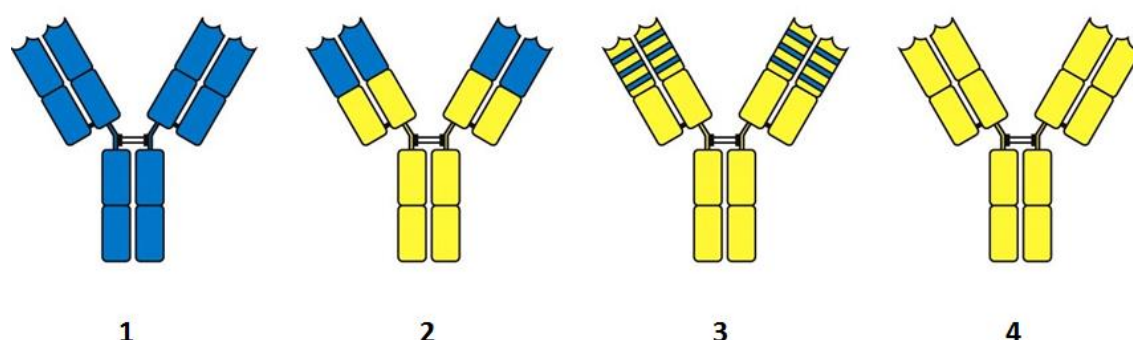


Figura 4 – Tipos de anticorpos monoclonais

1) *mAb* murino; 2) *mAb* quimérico; 3) *mAb* humanizado e 4) *mAb* humano.

Adaptado de (<http://course1.winona.edu/kbates/Immunology/chapter4-09.htm>)

Os primeiros *mAbs* produzidos tinham 100% de proteína murina e quando estes foram injectados no Homem houve uma produção de anticorpos contra esta proteína, que era estranha ao corpo humano. Estes anticorpos são denominados HAMA (*human anti-mouse antibodies*). Verificou-se que esta reacção apenas ocorria 2 a 4 semanas depois da primeira injeção, contudo os HAMA não criaram efeitos adversos significativos, sendo controlados com uma terapia anti-histamínica ou com corticóides (Green, 1999; Aires da Silva et al., 2008; Dostalek et al., 2013).

O grande impedimento do desenvolvimento dos *mAbs* murinos para a terapêutica nos humanos foi a dificuldade em baixar a imunogenicidade (Green, 1999; Nissim e Chernajovsky, 2008). Por isso, devido à grande percentagem de HAMA houve necessidade de alterar os *mAbs* murinos. Em 1984, desenvolveram-se os anticorpos quiméricos, estes têm uma região dominante variável fundida com regiões humanas constantes. Este avanço permitiu que as percentagens de resposta contra anticorpos monoclonais quiméricos (HACA – *human anti-chimeric antibodies*) fossem mais baixas que as percentagens HAMA, no entanto, não foram consideradas boas percentagens. Com o problema das altas percentagens de HAMA e depois de HACA, em 1986, os anticorpos foram humanizados através de *grafting mouse CDRs* (*complementarity determining regions*), permitindo a descida das respostas humanas contra os anticorpos monoclonais (Nissim e Chernajovsky, 2008; Miersch e Sidhu, 2012).

## **2.2. Técnica do rato transgénico**

A técnica do rato transgénico produz anticorpos humanos, através da inativação dos genes das imunoglobulinas do rato e da substituição das partes inativadas por segmentos de genes humanos, que codificam para as imunoglobulinas humanas (Aires da Silva et al., 2008).

O rato transgénico pode ser imunizado com o antígeno desejado, incluindo as proteínas humanas, e produzir anticorpos humanos de forma semelhante à técnica do hibridoma. Os animais transgénicos substituíram a técnica do hibridoma, no que diz respeito à produção de anticorpos monoclonais. Através da técnica transgénica os anticorpos humanos são introduzidos num rato, ao qual foram retiradas as imunoglobulinas loci. Este rato é imunizado com antígenos específicos e, assim, as suas células B são usadas para produzir hibridomas (como eram gerados os anticorpos murinos) que produzem anticorpos monoclonais humanos específicos. A resposta imune do rato transgénico é, por vezes, menos forte e, por isso, há necessidade de aumentar as imunizações (Nissim e Chernajovsky, 2008).

Duas empresas farmacêuticas focadas no desenvolvimento de técnicas de produção de anticorpos monoclonais a partir de ratos transgénicos são a Abgenix, que desenvolveu a técnica *Xenomouse*, e a *Medarex* que desenvolveu a técnica *UltiMab* (Aires da Silva et al., 2008).

Na década de 1980, surgiu a técnica *Xenomouse* que utilizava técnicas de ADN recombinante. Este tipo de técnica combinava o material genético humano com o do rato, produzindo assim *mAbs* parcialmente humanos e humanizados (Green, 1999).

A técnica *Xenomouse*, permitiu a produção de *mAbs* a partir de hibridomas e de linhas celulares recombinantes de animais transgénicos e/ou plantas, com maior estabilidade e, de fácil adaptação a um soro, de modo a conseguirem ser melhorados para posteriores aplicações. Com o desenvolvimento desta técnica foi possível utilizar-se directamente os hibridomas, para a produção de *mAbs*, e assim, reduzir o tempo de desenvolvimento pré-clínico, dando um início mais rápido aos ensaios clínicos. Desta forma, o primeiro *mAb* transgénico, ABX-IL8, foi criado pela técnica *Xenomouse* e foi produzido a partir de um hibridoma (Green, 1999; Kellermann e Green, 2002).

Foi demonstrado através de ensaios clínicos que os *mAbs* de animais desenvolvidos pela técnica *Xenomouse* tinham potencial tanto *in vitro* como *in vivo* e com as mesmas propriedades farmacocinéticas que um anticorpo humano (Green, 1999).

A principal vantagem dos *mAbs* transgénicos é terem, frequentemente, uma grande afinidade *in vivo* para a sua maturação, evitando a maturação *in vitro*. Para além, do resultado inicial ser um *mAb* humano intacto, inclui a porção *Fc* o que permite realização directa de um *screening* para uma função específica (Nissim e Chernajovsky, 2008).

Os anticorpos criados por esta técnica podem ser produzidos por linha celulares de hibridomas já imunizadas ou por linhas celulares como a linha celular de ovário de hamster chinês (CHO) (Nissim e Chernajovsky, 2008).

Outra vantagem dos *mAbs* totalmente humanos, em relação às outras classes, é o facto de permitirem várias administrações, sem causar alergias ou reacções imunogénicas, sendo de total segurança para doentes crónicos ou imunodeprimidos (Green, 1999; Kellermann e Green, 2002).

Nitidamente os animais transgénicos, mais especificamente, os ratos transgénicos oferecem uma plataforma viável para o desenvolvimento de anticorpos humanos. Em paralelo, existem tentativas de gerar anticorpos totalmente humanos em animais, com sistemas imunes humanos reconstituídos. Espera-se que através destas tentativas, surja uma nova técnica, que faça com que a função imunitária humana, resulte na geração de anticorpos específicos com elevada afinidade para o antígeno. Se tal acontecesse, a engenharia

molecular seria eliminada, no sentido de otimizar a eficácia e minimizar efeitos secundários (Harman et al., 2014).

Assim, a empresa *Medarex* criou a tecnologia *UltiMAb*, que usa uma linhagem de ratos transgênicos, a *HuMAb-mouse*. O rato é concebido para produzir anticorpos completamente humanos, que tendem a ter uma elevada afinidade com o alvo e ao mesmo tempo uma baixa imunogenicidade. Uma vez que o antígeno alvo é seleccionado, o sistema *UltiMAb* facilita a produção de uma variedade de anticorpos totalmente humanos contra vários epítomos no antígeno alvo ([www.genmab.com/partnering/licensing-opportunities/technology](http://www.genmab.com/partnering/licensing-opportunities/technology)).

### **2.3. Display technologies**

A evolução da engenharia celular permitiu várias alterações, tais como o peso molecular, a afinidade, a especificidade, entre outras características. Esta evolução levou a um notável progresso nas *display technologies*. Foi através dos avanços da engenharia celular que se conseguiu uma maior e melhor regulação dos anticorpos monoclonais, além do seu tempo de semi-vida enquanto fármacos (Nissim e Chernajovsky, 2008).

As *display technologies* podem ser divididas em *in vitro* (*phage display* e *ribosome display*) e *in vivo* (*bacterial*, *yeast display* e *mammalian cell surface display*). É importante ter em atenção que esta divisão, não é a mais clara, pois todas são trabalhadas em culturas *in vitro*. Para além desta classificação, as *display technologies* podem organizar-se em quatro tipos de bibliotecas: imunes; *naïve*; semi-sintéticas e sintéticas.

#### **2.3.1. Phage display**

A tecnologia mais simples para criar e desenvolver *mAbs* contra uma determinada proteína é a *phage display* (Nissim e Chernajovsky, 2008; Doerner et al., 2014).

Os fragmentos de anticorpo mais pequenos são *Fv* e *scFv*, estes reconhecem e conseguem ligar-se aos antígenos. Em 1960 verificou-se que era a VH dominante isolada que continha uma parte significativa da ligação original do anticorpo com o antígeno (Aires da Silva et al., 2008; Ravn et al., 2013).

Em 1985, George Smith clonou um fragmento de um gene e inseriu-o em filamentos de um bacteriófago, criando a *phage display technology* (Aires da Silva et al., 2008; H. Zhou, Zhang, Lu, Ji, e Rodi, 2011).

Em 1989, Greg Winter e a sua equipa basearam-se nestes conceitos e isolaram a cadeia variável dominante com antígenos contra uma lisozima derivada de uma biblioteca de VH murina imunizada. Apesar dos bons resultados, verificaram que os fragmentos de VH têm problemas de *folding*, baixa solubilidade e criam agregados quando lhes é retirada a VL dominante, pois fica mais exposta a superfície hidrofóbica dando azo aos agregados. Uma solução para ultrapassar estas questões foi utilizar VH de rato ou de coelho. Assim, as VH foram reconhecidas pelas mutações que reduziam a superfície hidrofóbica exposta e foram identificadas através de *Fv* e *scFv* nas bibliotecas de *phage display*. Outras alternativas, promissoras, são os anticorpos com as cadeias pesadas que ocorrem naturalmente, isto é anticorpos desprovidos da cadeia leve, como são o caso dos camelos e dos tubarões (Aires da Silva et al., 2008).

No início da década de 1990 vários laboratórios começaram a desenvolver sistemas de *phage display* para fragmentos de anticorpos. As experiências científicas tiveram como resultado um fago que expressava anticorpos à sua superfície, ou seja, que continha o gene que codificava para anticorpos (Aires da Silva et al., 2008; Nissim e Chernajovsky, 2008).

O processo de selecção na *phage display* pode ser dividido em quatro pontos principais:

- (a) Revestimento do anticorpo;
- (b) Incubação do repertório de fagos com o antígeno;
- (c) Lavagem para remover os fagos não específicos;
- (d) Eluição (processo de cromatografia) e re-amplificação dos fagos específicos de antígenos.

Normalmente são realizadas entre três a seis rondas de ligação, eluição e amplificação para obter anticorpos mais específicos e com uma alta afinidade. Os ciclos têm pressões selectivas para testar as ligações e os fagos que sobrevivem aos ciclos repetitivos de pressão selectiva, devido às suas capacidades de ligação favoráveis, podem ser isolados a partir de um dado repertório de anticorpos e ainda serem caracterizados e manipulados (Aires da Silva et al., 2008; Harel Inbar e Benhar, 2012; Hairul Bahara et al., 2013).

### 2.3.2. Ribosome display

A *ribosome display* foi descrita pela primeira vez por Mattheakis e pelos seus colegas em 1994. Este é um sistema de célula livre para a selecção *in vitro* de péptidos e proteínas de grandes bibliotecas (Aires da Silva et al., 2008; Harel Inbar e Benhar, 2012).

Na *ribosome display*, o ARN mensageiro é transcrito de uma biblioteca de ADN complementar de anticorpos, e de seguida sofre uma translação *in vitro* para produzir complexos, onde os ribossomas estão ligados ao ARN mensageiro e ao polipéptido nascente. O complexo-anticorpo-ribossoma-ARN mensageiro é seleccionado por uma ligação a um antígeno-alvo imobilizado. O ARN mensageiro seleccionado é separado do ribossoma por RT-PCR, para que se possa gerar uma “população” do ADN seleccionado, havendo assim cópias para futuras utilizações do mesmo (Nissim e Chernajovsky, 2008; H. Zhou et al., 2011; Boder, Raeeszadeh–Sarmazdeh, e Price, 2012; Harel Inbar e Benhar, 2012; Hairul Bahara et al., 2013).

A principal vantagem desta técnica é o passo do PCR, pois permite não só a maturação da afinidade do anticorpo, mas também uma produção de bibliotecas grandes, maiores que as *phage display* (Nissim e Chernajovsky, 2008). Outra vantagem, prende-se com o facto da *ribosome display* evitar os processos de transformação e de clonagem que são complexos (Aires da Silva et al., 2008).

### 2.3.3. Cell display

Em 1993, George Georgiou e o seu grupo de trabalho utilizaram uma bactéria como sistema de exibição de fragmentos de anticorpos. O grupo utilizou Lpp–OmpA chimera para exibir dois *scFv* na membrana celular da *E.coli*. A Lpp–OmpA é uma proteína híbrida que serve como veículo de direccionamento eficaz, para a localização de uma variedade de proteínas solúveis em células procariotas e eucariotas para a superfície da *E.coli*. Anos mais tarde, o mesmo grupo desenvolveu outra técnica, a Apex (*anchored periplasmic expression*) que se baseia na expressão das bibliotecas de anticorpos, através de *scFv*. Em ambas as abordagens, os clones de antígenos específicos foram isolados por citometria de fluxo e o seu ADN foi obtido por PCR (Harel Inbar e Benhar, 2012).



Estas duas tentativas de *bacterial surface display* não tiveram muito êxito, devido à tecnologia FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Por isto, as bibliotecas derivadas da *bacterial surface display* foram apenas utilizadas para a evolução de anticorpos já existentes (Harel Inbar e Benhar, 2012).

Em 2010, foram descritas duas aplicações desta *display technology*:

- (a) A expressão e a captura de IgG de comprimento completo solúveis no espaço periplásmico da *E. coli*
- (b) Pré-rastreo através de partículas de fago, que permite a redução do tamanho da biblioteca de acordo com o limite superior de FACS.

(Harel Inbar e Benhar, 2012; Doerner et al., 2014)

A combinação entre *phage display* e *bacterial surface display* ampliou as aplicações tradicionais desta plataforma de exibição para de novo a selecção de anticorpos a partir de grandes reportórios (Harel Inbar e Benhar, 2012).

Os dois sistemas que trabalham com células eucarióticas são a *yeast display* e a *mammalian cell display*; que têm a vantagem do *folding* dos anticorpos ocorrer no retículo endoplasmático e ainda ser possível fazer modificações pós-translacionais (H. Zhou et al., 2011; Boder et al., 2012).

A primeira vez que uma levedura foi utilizada, para exibição dos repertórios de anticorpos recombinantes, foi em 1997. A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* (Harel Inbar e Benhar, 2012).

Em alguns aspectos, a *yeast display* assemelha-se à *bacterial surface display*. As bibliotecas desta técnica são normalmente em *scFv*. Os *scFv* foram exibidos na parede celular da levedura, através da ligação com o receptor de adesão da alfa aglutinina. Os clones de antigénios específicos foram identificados por citometria de fluxo (Harel Inbar e Benhar, 2012).

A vantagem da *yeast display* em relação à *ribosome display* é a disponibilidade de modificação pós-translação na levedura hospedeira. Apesar desta desvantagem, a *ribosome display*, juntamente com a *phage display*, é preferida em relação à *yeast display* para a maturação da afinidade do anticorpo. Sendo a *yeast display* uma técnica menos utilizada (Nissim e Chernajovsky, 2008; Boder et al., 2012).

O uso das células de mamíferos como sistemas de exibição de anticorpos recombinantes começou em 2007 com o grupo de trabalho de Ira Pastan. Este grupo exibiu uma biblioteca de *scFv* fundida com o domínio N-terminal transmembranar do receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas humano (PDGFR), na superfície de células HEK-293T e conseguiu isolar anticorpos anti-CD22 de elevada afinidade (Bonanno et al., 2007; Harel Inbar e Benhar, 2012).

Existem poucos estudos sobre as aplicações das bibliotecas de anticorpos a partir das células mamíferas, por isso, ainda não se sabe ao certo o potencial desta técnica. Sabe-se que uma limitação desta técnica é ter reportórios pequenos (Harel Inbar e Benhar, 2012).

#### **2.3.4. Bibliotecas criadas a partir das *display technologies***

As bibliotecas criadas a partir das *display technologies* podem ser imunes, *naïve*, semi-sintéticas e sintéticas. Estas têm como fontes de pesquisa de anticorpos ou fragmentos de anticorpos o Homem, ratos, coelhos, tubarões e camelos. As bibliotecas diferem entre si na origem dos fragmentos de anticorpo, e no tamanho destes, bem como nas suas compatibilidades com as diferentes plataformas e as suas aplicações (Aires da Silva et al., 2008; H. Zhou et al., 2011; Harel Inbar e Benhar, 2012).

As bibliotecas têm uma mistura de filamentos de bacteriófagos, cada filamento exibe um fragmento de anticorpo diferente e específico. Para construir uma biblioteca os fragmentos de anticorpo como *Fab*, *scFv* ou *dAbs* (fragmentos de anticorpos dominantes) são clonados e fundidos com “*phage coat protein*”. Obtêm-se bibliotecas de milhões ou biliões de fagos diferentes e específicos (Nissim e Chernajovsky, 2008).

##### **2.3.4.1. Bibliotecas imunes**

As bibliotecas que foram construídas a partir de fragmentos de anticorpos isolados e provenientes de ARN mensageiro das IgG de animais imunizados ou de células B humanas imunizadas, são designadas de bibliotecas imunes. Quando uma biblioteca é produzida apenas por animais imunizados, tem a vantagem de obter mais anticorpos e mais específicos. A vantagem de uma biblioteca imune é poder usar vírus e toxinas que neutralizam os fragmentos

dos anticorpos, que podem ser utilizados para tratamentos com soro de anticorpos policlonais. Esta aplicação apesar de ser vantajosa, apresenta dois problemas, capacidade de produção limitada e as variações de lote para lote (Aires da Silva et al., 2008; Nissim e Chernajovsky, 2008; H. Zhou et al., 2011; Harel Inbar e Benhar, 2012).

#### **2.3.4.2. Bibliotecas *naïve***

As bibliotecas *naïve* foram criadas mais tarde e são obtidas através de grandes reportórios de fragmentos que são recuperados de doadores não imunizados. Neste caso, o ARN mensageiro das células B é isolado de órgãos hematopoiéticos e as regiões variáveis da IgM são amplificadas através do PCR (*polymerase chain reaction*) com degradação dos primeiros oligonucleótidos e clonados directamente para os vectores da *phage display* (Aires da Silva et al., 2008; Nissim e Chernajovsky, 2008; H. Zhou et al., 2011).

Os reportórios de IgM são preferidos em relação aos reportórios de IgG, pela simples razão de serem mais diversos, visto não ser necessário haver uma selecção de antígenos. Para além disso, contribuem também para uma biblioteca mais diversa:

- (a) Pesquisa das células B;
- (b) Imunização dos doadores;
- (c) Métodos de clonagem.

Evidenciam-se, assim, três vantagens deste tipo de biblioteca:

- (a) Anticorpos específicos podem ser produzidos sem qualquer contacto com antígenos;
- (b) Por ser grande e diversa, a biblioteca por ser utilizada para todos os antígenos;
- (c) Os anticorpos demoram menos de duas semanas a serem criados e os anticorpos humanos podem ser isolados.

Em contrapartida, o facto das bibliotecas *naïve* serem grandes têm de ser clonadas de modo a isolar os anticorpos com afinidades semelhantes. Para além do que já foi referido, muitas das vezes os anticorpos clonados não são expressos na superfície das bactérias, ou quando expressos têm uma expressão pobre e/ou com toxicidade para a bactéria hospedeira. Visto isto, as bibliotecas *naïve* tiveram de ser aperfeiçoadas (Aires da Silva et al., 2008).

Uma resolução para as desvantagens das bibliotecas *naïve* foi a criação de bibliotecas sintéticas.

#### **2.3.4.3. Bibliotecas semi-sintéticas e sintéticas**

As bibliotecas sintéticas são construídas *in vitro*; através de oligonucleótidos mutagênicos que são introduzidos nas estruturas do domínio variável (*Fab*) do anticorpo e que quando são introduzidos causam áreas de degenerescência nos CDRs de um ou mais genes V. A introdução da degenerescência num codão específico de um oligonucleótido sintético faz com que a aleatoriedade seja controlada (Aires da Silva et al., 2008; Miersch e Sidhu, 2012).

Foram desenvolvidos dois tipos de bibliotecas sintéticas:

- (a) Bibliotecas semi-sintéticas que combinam CDRs naturais com os artificiais;
- (b) Bibliotecas sintéticas com CDRs artificiais, ou seja, feitos pelo Homem.

(H. Zhou et al., 2011; Harel Inbar e Benhar, 2012)

A vantagem dos reportórios sintéticos ou semi-sintéticos é a capacidade de controlar o tipo e o número de segmentos de gene na *germline*, bem como, as sequências dos CDRs sintéticas (Nissim e Chernajovsky, 2008; Harel Inbar e Benhar, 2012).

### **2.4. Produção de anticorpos monoclonais**

A produção de anticorpos monoclonais engloba vários assuntos, como as culturas de células, as linhas celulares, os sistemas de produção, os métodos de operação, os processos de monitorização, processos estes que podem ser englobados em três processos designados por *upstream*, *biotransformação* e *downstream*.

#### 2.4.1. Cultura de células/Linhas celulares

No processo de desenvolvimento dos *mAbs* há duas questões essenciais (Birch e Racher, 2006):

- a primeira é como minimizar o tempo necessário para fornecer o material para os ensaios clínicos,
- a segunda é criar e desenvolver um processo que possa ter uma quantidade de fármaco suficiente para satisfazer a procura do mercado a um preço aceitável, por dose.

Atendendo à primeira questão, os processos para além de atenderem aos critérios de qualidade e de segurança, devem utilizar tecnologias de plataforma para a cultura de células. Para as linhas celulares o ideal é que sejam altamente produtivas e que sirvam para o fabrico a longo prazo, possibilitando, quando necessário, a utilização das mesmas células que foram anteriormente utilizadas (Birch e Racher, 2006).

A capacidade de produção de uma linha celular resulta da combinação de vários factores, tais como:

- (1) a transcrição do gene do anticorpo ser assegurada por um vector;
- (2) ser capaz de traduzir de forma eficiente o ARN mensageiro;
- (3) ligar-se ao anticorpo e modificar o mesmo.

Um outro aspecto muito importante, na produção dos *mAbs* é a escolha das linhas celulares. A escolha das linhas celulares é baseada nas suas características, isto é, na sua capacidade de produzir altas concentrações de anticorpos no sistema de produção escolhido, e na sua capacidade de produzir de forma consistente um produto com características uniformes bem como na velocidade com que as linhas celulares de alto rendimento podem ser obtidas. As características que foram referidas são as de maior importância, no entanto, não se deve menosprezar a disponibilidade do sistema de expressão adequado nem a importância da modificação pós-tradução dos anticorpos recombinantes (Birch e Racher, 2006).

Até 2006 houve referência de 18 anticorpos, dos quais 10 são fabricados em CHO (*Chinese hamster ovary*) e os restantes 8 através de células linfóides murinas (NS0 e Sp2/0–Ag14), sendo estas duas linhas as mais usadas nos ensaios clínicos. Os hibridomas murinos,

as linhas celulares PER.C6 e BHK21 são também muito utilizados (Birch e Racher, 2006; Butler e Meneses–Acosta, 2012).

A maioria dos anticorpos é produzida pela tecnologia de ADN recombinante, apesar de alguns (os anticorpos murinos) serem produzidos em hibridomas. Assim, os anticorpos recombinantes são produzidos em sistemas de expressão em células de mamíferos, em ovários de hamsters chineses (CHO) ou em linhas de células linfóides de murino (por exemplo, NS0, SP2/0–Ag14) (Birch e Racher, 2006; Chon e Zarbis–Papastoitsis, 2011; Rasmussen, Næsted, Müller, Tolstrup, e Frandsen, 2012).

O sistema de cultura preferido para uma cultura em grande escala (maior que 10L) é uma suspensão de célula única, definida quimicamente e o componente animal livre (CDACF – *chemically defined, animal component free*) no meio. As linhagens CHO são células aderentes, o que significa que requerem soro com os devidos nutrientes para o seu crescimento. A adaptação das linhas de células CHO recombinantes aderentes para suspensão e a adaptação do CDACF ao meio pode demorar até 9 meses, tornando-se num processo demorado e, por isso, incompatível com prazos curtos. Visto isto, a indústria pré adaptou as células CHO para a suspensão do CDACF no meio, reduzindo o tempo de 9 meses para 6 meses (Birch e Racher, 2006).

As linhas de células linfóides murinas, mais concretamente as NS0 e SP2/0–Ag14 são as mais utilizadas na produção de *mAbs*. Estas duas linhas derivam da linha celular de plasmacitoma, que é proveniente do rato BALB/c (Birch e Racher, 2006).

As linhas celulares PER.C6 são originárias das células da retina embrionária humana, que sofrem primeiro um processo de introdução de ácidos nucleicos (*transfection*) com a região do adenovírus E1, seguida por outra introdução de ácidos nucleicos de fenótipo imortal (Birch e Racher, 2006).

#### **2.4.2. Sistemas de produção**

Desde do primeiro anticorpo monoclonal licenciado em 1986, que começou uma grande aposta na produção de anticorpos monoclonais. A tecnologia e a biotecnologia evoluíram significativamente, desde da selecção das linhas celulares até aos métodos de purificação; permitindo, assim, uma produção em larga escala. Com este tipo de produção,

muitas empresas ficaram focadas na procura, criação e desenvolvimento ou aperfeiçoamento dos biorreactores. No entanto verificou-se que otimizar a produção das culturas de células seria melhor estratégia que a dos biorreactores (Rodrigues, Costa, Henriques, Azeredo, e Oliveira, 2009; Rasmussen et al., 2012).

Depois do método de ascite ter falhado; surgiram novos métodos de produção *in vitro*, tais como, os métodos de cultura de baixa densidade celular (sistemas de produção de pequena escala) e os métodos de cultura de elevada densidade celular (sistemas de produção de larga escala) (Falkenberg, 1998; Rodrigues et al., 2009).

Na produção de *mAbs* em pequena escala, existem dois métodos:

- (1) Cultura aderente
- (2) Cultura suspensa.

A cultura aderente é a mais comum, na qual as células mamíferas crescem adjacentes umas às outras, no entanto, tem o inconveniente de terem uma área de crescimento limitada. Enquanto na cultura suspensa não há o problema da área limitada, há a questão do tempo que as células demoram a habituarem-se ao meio, sendo esta a desvantagem deste método (Rodrigues et al., 2009).

Os sistemas de culturas de células de baixa densidade são de células estacionárias ou de células agitadas (Falkenberg, 1998; Rodrigues et al., 2009).

Na cultura de células estacionária, os nutrientes e o oxigénio são obtidos por difusão, tal como a exclusão dos produtos metabólicos gasosos e não gasosos. Este processo tem a limitação de apenas suportar entre  $10^5$  e  $10^6$  células por ml e de utilizar anticorpos com concentrações compreendidas entre 1 e 100µg por milhão ( $10^6$ ) de células por 24 horas. A cultura de células agitadas é uma cultura de células estacionária que foi agitada, de modo a acelerar o processo de difusão, consequentemente as células têm um acesso mais rápido aos nutrientes e oxigénio e, assim, multiplicam-se mais rápido. Apesar de este método ser mais eficiente que o método da cultura de células estacionária, o crescimento de células é ainda limitado pela acumulação dos produtos metabólicos (Falkenberg, 1998; Rodrigues et al., 2009).

Na cultura aderente, os sistemas utilizados em laboratório são os *T-flasks*, caixas de petri e *multiwell plates* (Figura 5). Estes sistemas são mantidos em condições de humidade e

de dióxido de carbono controladas para promover o crescimento celular. Neste tipo de cultura a concentração é proporcional à área existente para possível crescimento. Assim, se quisermos obter concentrações maiores temos de aumentar a área de superfície. Para ultrapassar este obstáculo, desenvolveram-se as *multiwell plates*, pois estas oferecem maiores superfícies (logo maiores concentrações celulares), e em alguns tipos, como é o exemplo da *Cell cube*, há a circulação contínua de um fluido, com suplementos necessários ao crescimento celular (Rodrigues et al., 2009).



Figura 5 – Sistemas utilizados em laboratório na cultura aderente

Primeira imagem (à esquerda) – *T-flask*. Imagem do meio – caixas de petri. Imagem à direita – placa de cultura

Adaptado de <http://www.globalscientific.co.uk/petri-dishes-and-their-different-types/> ;

[http://www.tpp.ch/page/produkte/02\\_zellkultur\\_flasche\\_spezial.php](http://www.tpp.ch/page/produkte/02_zellkultur_flasche_spezial.php) ;

<http://www.ytammed.com/danhmucsp/137/1>

Por exemplo, um sistema usado frequentemente para aumentar a área de superfície (na cultura aderente), obtendo maiores concentrações, é o *roller bottles*. Neste sistema, as células são submetidas a pequenas rotações/agitações, passando a cultura de células estacionária a cultura de células agitada. O facto de ser uma cultura de células agitada aumenta a transferência de oxigénio, sendo esta uma vantagem. Através deste sistema é possível obter o aumento de escala através do número de unidades movimentadas em paralelo (Falkenberg, 1998; Rodrigues et al., 2009).

Como exemplos de sistemas de culturas agitadas temos os *spinner flasks*, e os sistemas de *air lift* (bolsas feitas a partir de material permeável ao gás e que também pertencem a este grupo, desde que sejam agitadas numa centrifugadora) (Falkenberg, 1998; Rodrigues et al., 2009). Na cultura suspensa, a concentração é independente da superfície de área disponível, o que permite aumentar a densidade celular e, por conseguinte, a sua concentração. Neste tipo de cultura é possível utilizar os mesmos sistemas que na cultura aderente, com a diferença de que estes irão sofrer agitações, de forma a tornar a cultura suspensa. O inconveniente destes



sistemas são as limitações para a evaporação dos gases, por isso, são muito pouco utilizados para a cultura suspensa (Rodrigues et al., 2009).

As culturas de baixa densidade de células, contêm uma elevada contaminação do produto e, assim, a pureza dos anticorpos é muito baixa. Por este motivo, e pelos elevados custos dos meios de cultura de tecidos e dos suplementos necessários (como os soros) para a maioria das culturas de hibridomas, estes métodos são pouco aplicados (Falkenberg, 1998).

#### **2.4.3. Métodos de operação**

Os dois sistemas de cultura mais utilizados na produção em larga escala são o *fed-batch* e a cultura de perfusão contínua. (Figura 6). Existe, também, o método de operação *batch* (Birch e Racher, 2006).

Na cultura *batch* não há adição de nutrientes, enquanto que na cultura *fed-batch* adiciona-se um baixo volume com nutrientes. No sistema de cultura de perfusão contínua, no recipiente principal, são adicionados os nutrientes, ao mesmo tempo que é retirada a mesma quantidade de volume que entrou. Antes de a cultura ser removida, a biomassa é removida e depois volta a ser reposta no recipiente principal.

No sistema de cultura *fed-batch*, os nutrientes essenciais à cultura são adicionados em baixos volumes durante a fase de fermentação até à fase de manutenção, e a cultura é retirada no final do ciclo (Figura 6). Este sistema é o mais utilizado, uma vez que é fácil de manusear, reduz o risco de contaminação e consegue volumes altos de produção (Birch e Racher, 2006; J. X. Zhou, Tressel, Yang, e Seewoester, 2008).

Os sistemas de cultura contínua podem ser divididos em dois tipos, a cultura *chemostat* e a perfusão de cultura. Na cultura *chemostat* as células são removidas continuamente do biorreactor com o meio “gasto”. Nos sistemas de cultura de perfusão contínua, os meios de cultura são frescos e adicionados continuamente ao reactor e os meios que foram utilizados (considerados já “gastos”) são retirados; assim, as células ficam retidas em dispositivos de retenção que podem ser internos ou externos ao biorreactor. Isto é, quando um volume de meio fresco é adicionado, a mesma quantidade de volume de meio “gasto” é retirado, enquanto isto, as células ficam retidas em sistemas de retenção e depois voltam a ser

inseridas no biorreactor. Os dispositivos/sistemas de retenção podem ser internos ou externos ao biorreactor principal.

As desvantagens do sistema de cultura contínua são o tempo adicional gasto e a complexidade envolvida em todo este processo. Por outro lado, estes sistemas têm rendimentos de anticorpos dez vezes superiores aos dos sistemas *batch* e *fed-batch* (Birch e Racher, 2006; Rodrigues et al., 2009).

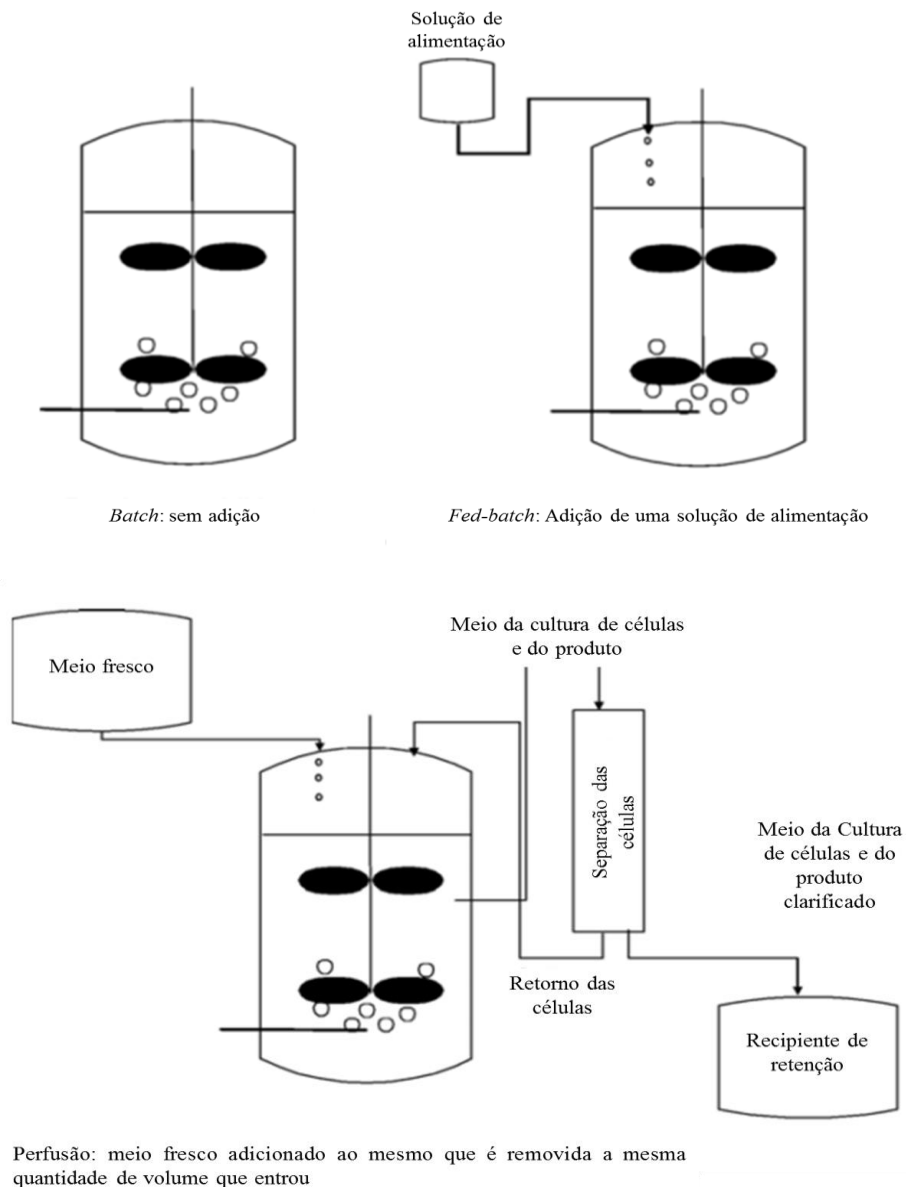


Figura 6 – Métodos de operação.  
Diferença entre *batch*, *fed-batch* e sistema de perfusão contínua.  
Adaptado de (Birch e Racher, 2006)

#### 2.4.4. Processos de monitorização

A cultura de células de mamíferos é a preferida para a produção em larga escala; pois permite a produção de anticorpos monoclonais em grandes quantidades. No entanto, a produção pode ser maximizada através de muitas abordagens. Uma abordagem na qual a indústria continua a apostar, com muito empenho, é a rentabilização e maximização dos biorreactores; uma vez que, estes têm um grande impacto a nível económico. Um aspecto muito importante, mas que se nota pouco relevante são os parâmetros de monitorização.

É através dos parâmetros de monitorização que sabemos o *follow-up* do crescimento da cultura, bem como, o seu metabolismo. Para além disso, são estes parâmetros que detectam possíveis anormalidades, por exemplo através do pH.

Alguns dos parâmetros são, entre outros:

- Temperatura;
- pH;
- Osmolaridade;
- Oxigénio dissolvido;
- Dióxido de carbono;
- Concentração dos nutrientes e dos metabolitos;
- Glicosilação.

(Rodrigues et al., 2009)

#### 2.4.5. Processo *upstream*

Uma produção de pequena escala, num laboratório, produz concentrações de *mAbs* entre 1 e 100  $\mu\text{m}$  /mL. Estas concentrações são consideradas baixas, quando comparadas com a procura por *mAbs*, não correspondendo ao que o mercado biofarmacêutico necessita. Visto isto, a indústria farmacêutica começou a apostar na produção em larga escala dos anticorpos monoclonais (Rodrigues et al., 2009).

Ao longo dos anos, os anticorpos monoclonais foram-se destacando e ganhando importância. Como consequência do seu destaque, a sua procura aumentou muito, obrigando

a indústria a criar e a desenvolver novos métodos de produção, para que os *mAbs* pudessem ser produzidos em larga escala e com bons rendimentos.

O processo mais comum da produção em larga escala de produtos farmacêuticos, incluindo os *mAbs*, é o processo das células em suspensão. Depois de se obterem os *mAbs* pretendidos, estes são sujeitos a processos de adaptação. Estes processos que, por vez, são limitativos e atrasam a linha de produção dos mesmos (Rita Costa, Elisa Rodrigues, Henriques, Azeredo, e Oliveira, 2010).

As linhas celulares CHO e NS0 são as mais utilizadas a nível industrial.

A produção dos anticorpos monoclonais pode ser dividida em três processos, o processo *upstream*, processo de produção/fermentação e o processo *downstream*. Os três processos são comuns às técnicas do hibridoma, do rato transgénico e às *display technologies*.

Feita a selecção da linha celular, as células sofrem o processo de transfecção e são obtidos os clones de anticorpos monoclonais. O processo de transfecção é a introdução de ADN nas células e envolve vários processos, como o desenho do vector de expressão (Rita Costa et al., 2010).

Os *mAbs* obtidos por hibridoma, pelo método do rato transgénico ou pelas *display technologies* são, depois, submetidos a processos de congelamento e são colocados em bancos de células.

O processo *upstream* começa com uma cultura de células que estava armazenada num banco de células. Estas células são retiradas do banco, e sofrem um processo de descongelamento, depois são transferidas para um *shake flask* e são novamente transferidas para outro *shake flask* ou *wave bioreactor*. Este é o primeiro passo e denomina-se de processo de inoculação. De seguida, a cultura de células é cedida para um biorreactor, no qual é submetida aos métodos de operação, normalmente *fed-batch* ou perfusão contínua, bem como, ao processo de produção/fermentação de cultura de células. Depois do processo da produção/fermentação de cultura de células, ocorre uma recuperação das células e a remoção dos desperdícios celulares, através de processos de centrifugação e filtração por membrana. (Figura 7) (J. X. Zhou et al., 2008).

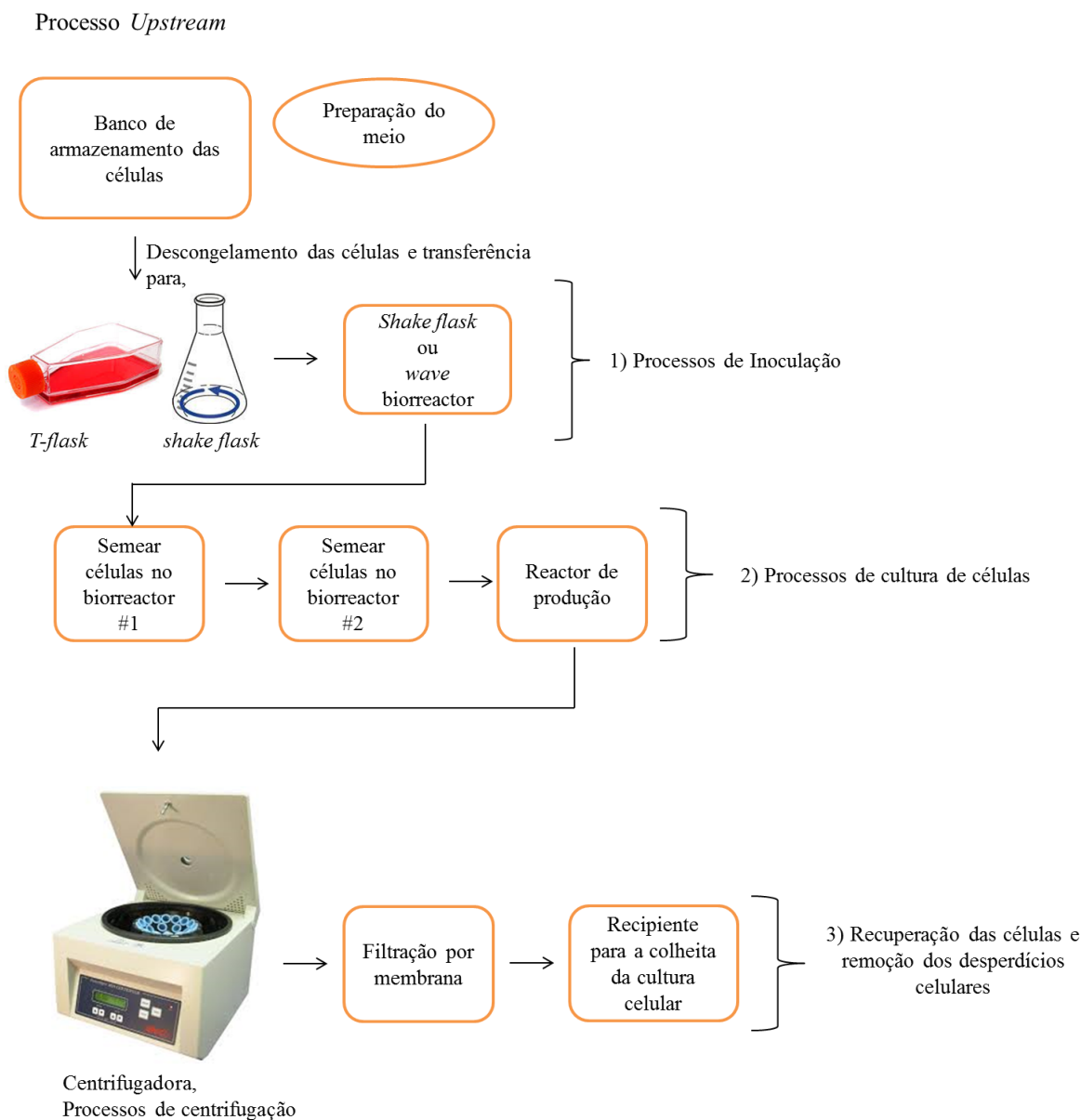


Figura 7 – Processo *upstream* (1) e processo de produção/fermentação de células (2 e 3)

O processo de *upstream* e o processo intermédio (produção/fermentação de cultura de células) envolvem também processos de aperfeiçoamento ou criação de novos biorreactores; a optimização dos processos já existentes e das manipulações dos sistemas de culturas, e do seu meio (Jain e Kumar, 2008).

Os biorreactores utilizados no processo *upstream* são:

- (1) Biorreactor de tanque agitado (*Stirred tank biorreactor*);
- (2) Biorreactor *Airlif*;
- (3) Biorreactores de culturas de alta densidade – um exemplo é o reactor de fibra oca;

- (4) *Fluidized bed reactors – microcarrier system*;
- (5) *Fixed bed reactors*;
- (6) Reactores de membrana – são exemplos *miniPERM* (Vivascience) e *CELLine* (Integra Biosciences);
- (7) Reactores descartáveis;
- (8) Biorreactores de onda;
- (9) *Cell cube*;
- (10) *Cell factory*.

(Jain e Kumar, 2008; Rodrigues et al., 2009)

#### **2.4.6. Processos *downstream***

O processo *downstream* é a purificação do produto obtido nos processos *upstream*, e de produção/fermentação de células. A purificação tem de assegurar que o produto final não está contaminado, para além de satisfazer os regulamentos de qualidade e segurança do produto (Butler e Meneses–Acosta, 2012).

O processo de *downstream* pode ser dividido em 5 passos evidentes:

- (1) Cromatografia por afinidade com a proteína A;
- (2) *Polishing chromatography*;
- (3) *Polishing chromatography* (este passo é realizado duas vezes);
- (4) Filtração viral;
- (5) *Ultrafiltration e diafiltration*.

O processo da purificação começa como uma filtração ao produto proveniente do processo produção/fermentação da cultura de células. A filtração é, normalmente, realizada num biorreactor. De seguida, ocorre o passo da captura, pelo método de cromatografia por afinidade com a proteína A, que é o passo que mais se destaca. Existem vários tipos de cromatografia: hidrofóbica, troca de iões e por afinidade com a proteína A. Na produção de anticorpos monoclonais, a cromatografia de eleição é a cromatografia por afinidade com a proteína A. A proteína A funciona como uma resina de purificação e cria uma matriz que promove a ligação por afinidade com o fragmento *Fc* do anticorpo. O processo de eluição é rápido e fácil e não afecta as características da proteína (Birch e Racher, 2006; Shukla e

Thömmes, 2010; Chon e Zarbis-Papastoitsis, 2011; Ayyar et al., 2012; Butler e Meneses-Acosta, 2012).

Depois da cromatografia por afinidade com a proteína A, ocorrem duas *polishing chromatographies* que se destinam à remoção de contaminantes proteicos provenientes das células ou do meio ou de ADN. Para além deste tipo de contaminantes, também se podem ter de remover contaminantes derivados do produto (degradações ou agregados). Consoante o método de produção, podem ser removidos outros contaminantes, por exemplo, contaminantes provenientes dos passos utilizados com a proteína A. Nas células mamíferas, para além do acima referido, é necessário fazer pelo menos dois passos para remover os possíveis vírus, esta remoção é feita através de uma filtração com filtros de 0.22 µm e tratamentos com um pH baixo (pH ácido), por vezes, também é necessária a utilização de solventes/detergentes (Birch e Racher, 2006; Shukla e Thömmes, 2010; Chon e Zarbis-Papastoitsis, 2011; Ayyar et al., 2012; Butler e Meneses-Acosta, 2012).

Por fim, ocorre uma filtração viral e uma *ultrafiltration* e uma *diafiltration*. Estes processos têm como função a diminuição do volume do produto. Pois através dos passos anteriores, já foi possível remover grande parte das impurezas e, conseqüentemente, o volume do produto. Estes processos além de diminuírem o volume do produto, permitem a troca de tampões. (Figura 8 e 9) (Birch e Racher, 2006; Shukla e Thömmes, 2010; Chon e Zarbis-Papastoitsis, 2011; Ayyar et al., 2012; Butler e Meneses-Acosta, 2012).

Apesar da cromatografia por afinidade com a proteína A ser um excelente método de purificação dos *mAbs*, este tem a desvantagem de ter elevados custos, que se reflectem no preço do produto final (Birch e Racher, 2006; Butler e Meneses-Acosta, 2012). Assim, foram criadas alternativas a este tipo de cromatografia. Como exemplo existe a cromatografia por troca de catiões (CEX), que utiliza a vantagem do ponto isoeléctrico dos *mAbs*, de modo a que estes se liguem à resina existente na coluna, quando em meios acéticos fracos. Já existem anticorpos que utilizam esta cromatografia, é o caso dos anticorpos monoclonais Synagis e Humira. Outra solução é realizar uma peguilação, ou seja, o PEG (polietilenoglicol) provoca o aumento da ligação do produto ao suporte da cromatografia, facilitando, ao mesmo tempo, a remoção de moléculas de elevado peso molecular, uma vez que estas têm ligações mais fracas com a coluna de cromatografia do que as moléculas de baixo peso molecular (Birch e Racher, 2006; Shukla e Thömmes, 2010; Chon e Zarbis-Papastoitsis, 2011; Ayyar et al., 2012; Butler e Meneses-Acosta, 2012).

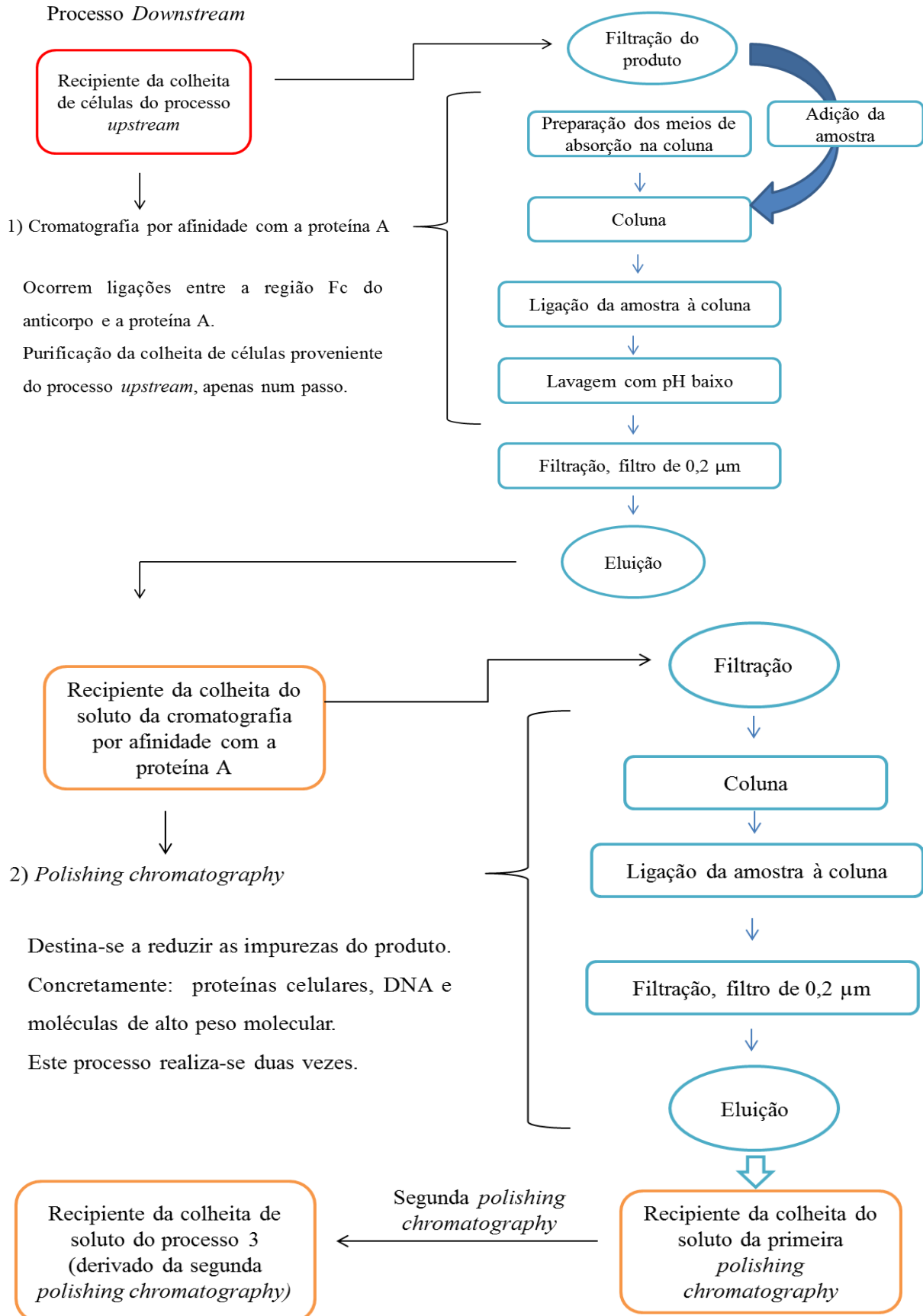


Figura 8 – Processo *downstream* – Cromatografia por afinidade com a proteína A e *polishing chromatography*. Adaptado de (Ayyar et al., 2012)



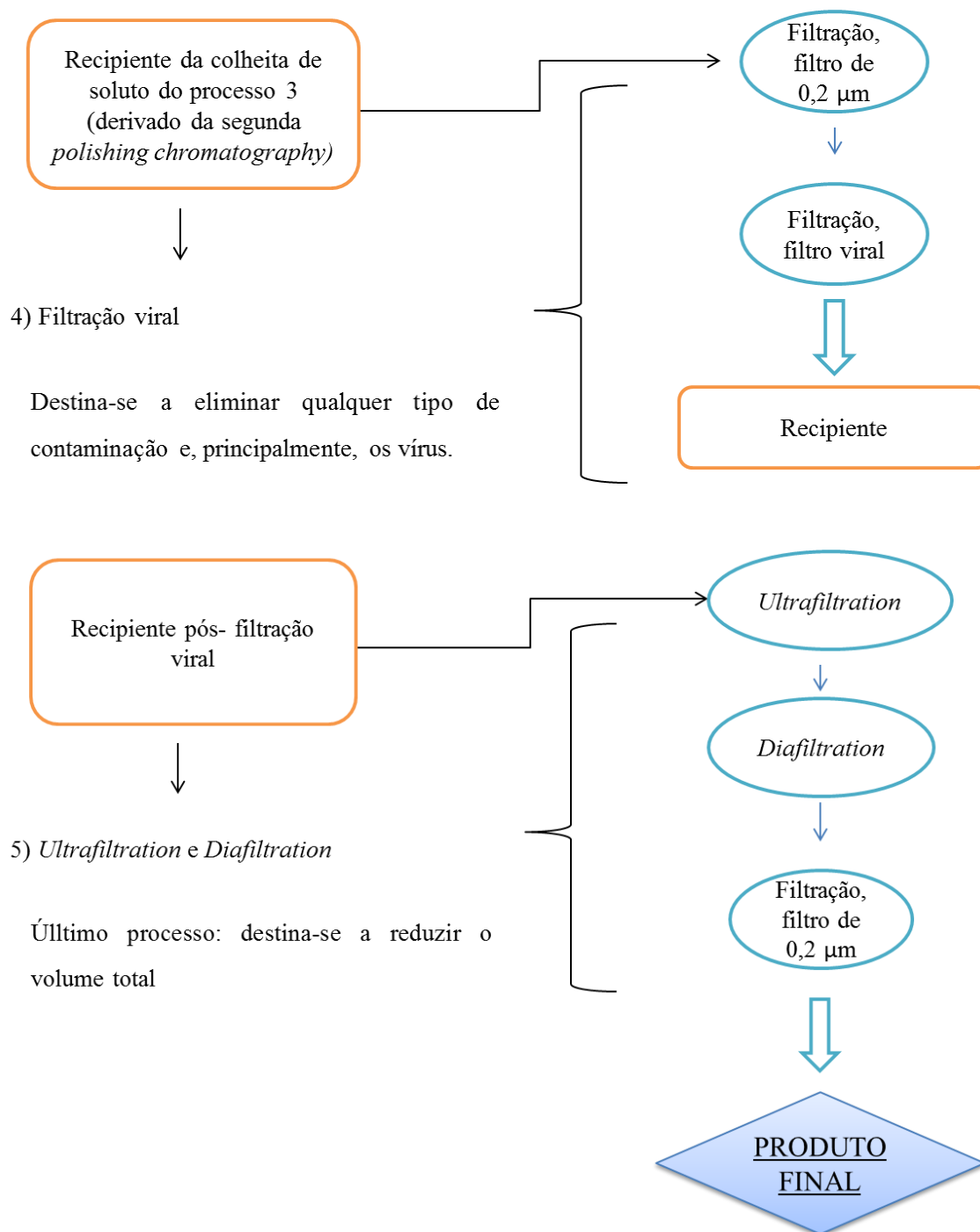


Figura 9 – Processo *downstream* – Filtração viral; *ultrafiltration* e *diafiltration*.  
Adaptado de (Ayyar et al., 2012)

Os rendimentos de *downstream* rondam os 60 e os 80%, e dependem do número de passos realizados para a purificação dos *mAbs*. Com o aumento das concentrações do *upstream*, começou-se a tomar mais atenção aos custos de *downstream*, pois é uma proporção

significativa nos custos. Visto isto, há que encontrar soluções para que se consiga reduzir os volumes, com o objectivo de reduzir os custos (Birch e Racher, 2006).

## **2.5. Engenharia celular para aumentar a produtividade ou modificar as características do produto**

Nos últimos anos, foram feitos esforços e melhorias na aplicação das células mamíferas na produção de proteínas recombinantes, a fim de modificar as células hospedeiras para que haja uma maior expressão das proteínas e uma melhor qualidade das mesmas. Mais concretamente, as manipulações têm sido direccionadas para o controlo do crescimento celular, da prevenção da morte celular, da promoção pós-translação e do *folding* ou do aumento da capacidade nutritiva do meio (Rita Costa et al., 2010).

Os sistemas de expressão, utilizados na produção de *mAbs* recombinantes, têm um enorme potencial para produzir linhas de células, tendo taxas de produção específicos ( $Q_p$ ). O objectivo é criar linhas de células que tenham uma alta  $Q_p$  mas que tenham também as características que levam à alta produtividade no processo de fabrico. Visto isto, as linhas celulares resultantes são seleccionadas para o crescimento em cultura de suspensão, usando um meio quimicamente definido de animal de componente livre (CDACF), para a estabilidade e ainda para a capacidade de sofrerem modificações pós-transdução (Birch e Racher, 2006).

Nos sistemas de expressão, os vectores normalmente utilizados são glutamina sintetase (GS) e di-hidrofolate reductase (DHFR). Estes vectores têm fortes promotores para dirigir a expressão dos genes do anticorpo e são, geralmente, de origem viral (por exemplo citomegalovirus humano) ou derivados de genes que são altamente expressados nas células mamíferas (Birch e Racher, 2006).

É possível aumentar a produção dos *mAbs* através dos processos de transcrição, isto é, os sistemas de vectores de expressão foram desenvolvidos de forma a dar elevados níveis de ARN mensageiro. Existem várias opções para aumentar a transcrição, uma opção é a amplificação do gene através de um vector de expressão (de modo a que os genes de interesse se liguem a um gene amplificável, por exemplo: timidina-quinase, adenosina-desaminase, GS ou DHFR). Se os vectores inibirem uma enzima essencial ao funcionamento da célula, a

célula só sobrevive se produzir excessivamente esta mesma enzima. Consequentemente há um aumento do ARN mensageiro, ou seja, ou houve uma ampliação, pois o número de cópias do gene também aumentou ou a transcrição foi muito eficiente. No entanto, esta opção tem inconvenientes, pois a amplificação dos transgenes pode, frequentemente, resultar num fraco desempenho no crescimento da população celular e alterar o metabolismo celular. Pode, ainda, alterar a estabilidade inerente da expressão e exigir a presença continuada do vector selectivo. Posto isto, se for imprescindível a presença do vector selectivo, é necessário demonstrar no processo de purificação, a sua remoção (Birch e Racher, 2006; Jain e Kumar, 2008).

O sistema GS e alguns dos componentes do DHFR não dependem da amplificação para atingir as altas produtividades, pois estes sistemas são baseados na inserção da construção de anticorpos numa região de transcrição activa, sendo assim que alcançam as altas produtividades (Birch e Racher, 2006).

Elevadas concentrações de *mAb* são o resultado de altos valores de taxa de produção específicos ( $Q_p$ ) e de rendimento espaço-tempo das células viáveis. A  $Q_p$  pode ser limitada por processos de transcrição *downstream* e isto pode ser rectificado em apenas alguns casos com a engenharia de vectores, já acima referidos (Birch e Racher, 2006).

Outro exemplo de engenharia de linha celular, para obter elevados rendimentos espaço-temporais da biomassa viável, foi a utilização de linhas de células capazes de crescer a uma concentração muito alta, que depois se mantém durante anos. A manutenção da alta viabilidade de tais culturas requer a minimização da taxa de mortalidade, cuja principal causa de morte, em culturas, é a apoptose. A apoptose pode ser induzida de muitas formas, uma das formas é a limitação de nutrientes, por isso, uma estratégia seria evitar a limitação de nutrientes. Embora a cultura em *fed-batch* retarde a apoptose, continua a haver sempre o risco de as células morrerem devido a apoptose. Outra alternativa é manipular a apoptose nas linhas celulares, regulando muito bem as vias da morte celular (Birch e Racher, 2006).

Uma área muito importante, actualmente, é a engenharia que trabalha com oligossacáridos através da pesquisa de uma forma de potenciar os *mAbs*. Isto ocorre através de alterações nas características das células T, em determinadas etapas pós-translação como a glicosilação (verificou-se a citotoxicidade celular dependente de anticorpos – ADCC – *antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Acredita-se que a ADCC desempenha um papel

importante na função de alguns *mAbs* terapêuticos (Birch e Racher, 2006; Nissim e Chernajovsky, 2008).

### 2.5.1. Engenharia celular multivalente, bi-específica e fragmentos bi-funcionais

Uma IgG inteira pode ser convertida em *Fabs*, *scFv* e em *single domains*. A IgG ao ser convertida em fragmentos perde alguma da sua actividade na ligação anticorpo-antigénio ou, neste caso, fragmento-antigénio. Esta perda pode ser compensada pela junção de fragmentos e, consequentemente, pelo aumento da sua actividade (na ligação fragmento-antigénio). Por exemplo, os *Fab* têm sido quimicamente cruzados e ligados a outros *Fab*, passando a ser fragmentos di e/ou trivalentes. Outra tentativa, é criar *scFv* com uma diminuição de aminoácidos nas ligações, ou seja, de 15 a 20 aminoácidos passar a ter 5 ou menos aminoácidos. Os fragmentos com 5 aminoácidos e com dois locais de ligação formam uma molécula dimérica chamada de *diabody*, e se houver uma redução de aminoácidos, menos de 5, as moléculas podem ser triméricas ou tetraméricas (*triabody* e *tetrabody* respectivamente). Outra solução é conseguir um arranjo entre dois *scFv* ligados por um polipéptido flexível ou ligados a uma cadeia de polipéptidos simples (Aires da Silva et al., 2008).

Geralmente, os fragmentos de anticorpo multivalente são monoespecíficos, mas as estratégias acima referidas, podem, por vezes, criar um fragmento de anticorpo bi-específico. Se os fragmentos são bi-específicos podem, então, ligar-se a mais do que um antigénio e a antígenos diferentes (Aires da Silva et al., 2008).

Muitos dos *mAbs* desenvolvidos são compostos totalmente por IgG, esta imunoglobulina proporciona um tempo de semi-vida longo e também as suas funções específicas. Por vezes estas duas características da IgG, não são o ideal, pois podem causar citotoxicidade a níveis inconvenientes para o nosso organismo. Posto isto, moléculas mais pequenas como *Fab* e *Fv* são escolhidas em certas terapêuticas, por não terem um tempo de semi-vida tão longo como um anticorpo, e por não causarem tanta citotoxicidade (Aires da Silva et al., 2008; Hairul Bahara et al., 2013).

Como já referido, estas moléculas são consideradas “armas” poderosas na imunoterapia, pois têm pesos moleculares reduzidos e penetram facilmente nas células alvo.

Para além disso, podem-se fundir com outras moléculas e conduzi-las até às células alvo (Aires da Silva et al., 2008; Malpiedi et al., 2013). Através destas características, a engenharia celular teve um papel importante no que diz respeito à criação de fragmentos bi-funcionais.

Como algumas vantagens adicionais, podemos incluir a facilidade de produção, a sua alta estabilidade, uma acrescida capacidade de penetração em tecidos tumorais e uma rápida limpeza do sangue.

A empresa Genmab, uma empresa dinamarquesa fundada em 1999, criou a tecnologia DuoBody em 2010 e a HexaBody em 2012. A primeira tecnologia é uma plataforma de anticorpos bi-específicos terapêuticos, utilizados para descobrir novos fármacos e na sua produção em larga escala. A segunda tecnologia cria anticorpos com as suas funções melhoradas ([www.genmab.com/about-us](http://www.genmab.com/about-us))

Como resultado, é claro que o domínio dos anticorpos individuais deverá rapidamente tornar-se uma das mais promissoras terapias de anticorpos monoclonais (Aires da Silva et al., 2008; Malpiedi et al., 2013).



### 3. Anticorpos monoclonais

#### 3.1. Aplicações terapêuticas

Os anticorpos monoclonais foram desenvolvidos com o intuito de tratar doenças inflamatórias e condições oncológicas. Porém, nos dias de hoje, são utilizados num espectro muito mais alargado de patologias. São exemplo, as doenças auto-imunes, oncológicas, cardiovasculares e infecciosas. Um ponto relevante, enquanto fármacos, é o seu alvo terapêutico, para que sejam evitados os efeitos secundários normalmente gerados por terapêutica prolongada (Green, 1999; Bai, Burman, e Gledhill, 2000; Canziani, Klakamp e Myszka, 2004; Nissim e Chernajovsky, 2008; Elvin et al., 2013).

Nas últimas décadas, os *mAbs* têm ganho uma enorme importância na área da medicina, mais concretamente nos diagnósticos e terapêuticas (Rodrigues et al., 2009). Tudo isto levou ao seu crescente reconhecimento científico, comprovado pelo número de anticorpos quiméricos e humanizados aprovados pela *FDA* (*Food and Drug Administration* – americana) e que está constantemente a aumentar (Nissim e Chernajovsky, 2008).

Ora, como conhecido, a utilidade clínica do anticorpo depende da afinidade deste com o seu alvo, o antígeno. Como tal, se se melhorar esta afinidade, a sua potência melhora, a sua farmacocinética também e existe a possibilidade de baixar a dose terapêutica (Nissim e Chernajovsky, 2008).

Os *mAbs* concebidos pelas técnicas do hibridoma ou por ratos transgénicos têm, geralmente, uma alta afinidade. No entanto, a *display technology* consegue adequar a afinidade de cada anticorpo, ou seja, a ligação óptima com o alvo terapêutico por maior afinidade (Nissim e Chernajovsky, 2008).

A farmacocinética é um dos aspectos mais importantes do anticorpo, porque determina o potencial clínico do anticorpo. O desejado num anticorpo monoclonal é um tempo de semi-vida relativamente alto, porém, como já referido, existem situações em que um tempo de semi-vida longo não é desejável e, por isso, alternativas como os fragmentos de anticorpos são as escolhidas, devido ao seu baixo peso molecular e de haver a hipótese de fundir mais do que um fragmento (Nissim e Chernajovsky, 2008).

O tempo de semi-vida dos fragmentos pode ser, ainda, modificado, com a adição de polietilenoglicol (PEG). Um exemplo é o anticorpo Cimzia, que aumenta a sua semi-vida para uma média de 14 dias. A vantagem dos anticorpos peguilados, para além do tempo de semi-vida é não haver efeitos secundários causados pelos fragmentos (Nissim e Chernajovsky, 2008).

Mais de 100 anticorpos monoclonais estão em ensaios pré-clínicos e clínicos. De acordo com um relatório da Sociedade do Anticorpo (28/2/2013), 36 *mAbs* foram aprovados ou ainda estão em revisão pela União Europeia e pelos Estados Unidos da América (Malpiedi et al., 2013; Doerner et al., 2014; dos Santos, Rosa, Aires-Barros, Tover, e Azevedo, 2014).

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais e a sua utilização clínica.

Os anticorpos a amarelo estão em vias de serem retirados do mercado. Os anticorpos a laranja foram retirados do mercado. Adaptado de (Elvin et al., 2013; Rodrigues et al., 2009; Shukla e Thömmes, 2010; [www.immunologylink.com/FDA-APP-Abs.html](http://www.immunologylink.com/FDA-APP-Abs.html), n.d.)

Anticorpo monoclonal (nome comercial)	Tipo de anticorpo	Utilização clínica	Empresa	Ano
ORTHOCLONE	Murino	Rejeição aguda de um rim transplantado	Ortho Biotech	1986
OKT3	Murino	Rejeição de transplante de coração e/ou de fígado		1993
REOPRO	Murino	Angioplastia transluminal percutânea	Centocor/Eli Lilly	1994
PANOREX	Murino	Cancro do cólon	Centocor/ GlaxoSmithKline	1995
ZENAPAX	Humanizado	Rejeição aguda de um rim transplantado	F. Hoffmann–La Roche	1997
MABTHERA/ RITUXAN	Quimérico	Folicular CD20 positivo não–Hodgkin Linfoma de células B (NHL), Artrite reumatóide	Biogen IDEC/Genzyme/F. Hoffman –La Roche	1997
SIMULECT	Quimérico	Rejeição de um transplante renal	Novartis	2006
SYNAGIS	Humanizado	Doença do vírus sincicial respiratório	Abbott/MedImmune	1998
HERCEPTIN	Humanizado	Cancro da mama metastático com expressão do gene ERBB2	F. Hoffmann–La Roche/ Genentech	1998
REMICADE	Quimérico	Doença de Crohn (1998), Espondilite anquilosante, psoríase e artrite reumatóide (1999)	Centocor	1998
ENBREL	TNF $\alpha$ receptor solúvel fundido com Fc da IgG1	Artrite reumatóide, psoríase, espondilite anquilosante	Amgen	1998
MYLOTARG	Humanizado	Leucemia mieloide aguda	Wyeth	2000
CAMPATH/ MABCAMPATH	Humanizado	Células B da leucemia linfocítica crónica	Berlex/Genzyme/Millennium	2001
HUMIRA/ TRUDEXA	Humano	Psoríase e artrite reumatóide	Abbott	2002



Anticorpo monoclonal (nome comercial)	Tipo de anticorpo	Utilização clínica	Empresa	Ano
ZEVALIN	Murino	Linfoma das células B não-Hodgkin	Biogen IDEC/ Schering AG	2002
RAPTIVA	Humanizado	Psoríase	Genentech/Merck Serono International/Xoma	2003
XOLAIR	Humanizado	Asma alérgica, asma persistente	Genentech/Novartis/tanox	2003
BEXXAR	Murino	Folicular CD20 positivo não-Hodgkin Linfoma de células B (NHL)	GlaxoSmithKline/Corixa	2003
AMEVIVE	LFA3 fundido com a <i>Fc</i> da IgG1	Psoríase	Biogen-Idex	2003
AVASTIN	Humanizado	Cancro colo-rectal com metástases e cancro do pulmão com metástases de células grandes	Genentech	2004
ERBITUX	Humanizado	Cancro colo-rectal com metástases	Merck e Co/ImClone	2004
TYSABRI	Humanizado	Esclerose múltipla	Biogen IDEC/Elan	2004
ORENCIA	CTLA4 fundido com a <i>Fc</i> da IgG1	Artrite reumatóide	Bristol-Myers Squibb	2005
VECTIBIX	Humano	Cancro colo-rectal	Amgen	2006
LUCENTIS	Fragmento <i>Fab</i>	Degeneração macular neovascular relacionada à idade	Genentech/Novartis	2006
SOLIRIS	Humanizado	Hemoglobinúria paroxística nocturna	Alexion	2007
ARCALYST	Receptor IL-1 fundido com <i>Fc</i>	Criopirina associado ao síndrome periódico	Regeneron	2007
CIMZIA	Fragmento <i>Fab</i> Peguilado	Doença de Crohn	Celltech, UCB	2008
STELARA	Humano	Psoríase	Centocor	2008
SIMPONI	Humano	Artrite reumatóide	Centocor	2008
ACTEMRA	Humanizado	Artrite reumatóide	Roche	2009
ILARIS	Humano	Inflamatório	Novartis	2009
ARZERRA	Humano	Cancro	Genmab	2009
PROLIA	Humano	Perda óssea	Amgen	2010
BENLYSTA	Humano	Doenças auto-imunes	Human Genome Sciences	2011
YERVOY	Humano	Cancro	BMS	2011
ADCETRIS	Quimérico	Cancro	Seattle Genetics	2011
PERJETA	Humanizado	Cancro	Genentech/Roche	2012
ABTHRAX	Humano	Anti-infecção	GlaxoSmithKline	2012
KADCYLA	Humanizado	Cancro	Genentech/Roche	2013
GAZYVA	Humanizado	Cancro	Genentech/Roche	2013

### 3.2. Biossimilares

Um produto biossimilar, em termos gerais, é um medicamento semelhante a um medicamento original já existente no mercado, como se fosse um genérico.

Segundo a *FDA (Food and Drug Administration)* americana um biossimilar é um produto altamente semelhante a um produto de referência, tendo apenas pequenas diferenças na sua composição, mas estas não comprometem a sua terapêutica, sendo esta igual à do produto de referência. Os biossimilares são também conhecidos como clones de produtos, para os quais a sua patente já expirou (Barbosa, Kumar, Loughrey, e Singh, 2012; Gagnon, 2012; Lee et al., 2012).

Uma vez que a primeira geração de biomedicamentos perdeu a patente, muitas empresas têm apostado na produção em larga escala de anticorpos monoclonais, são exemplos Herceptin, Remicade e Rituxan (Lee et al., 2012).

Em 2009 a Organização Mundial de Saúde, que dita e coordena as *guidelines* das Nações Unidas, finalizou as *guidelines* quanto aos biossimilares (Schiestl, 2011).

A comparação entre um biossimilar e o produto de referência é muito mais extensa que o estudo de bioequivalência de um genérico com o medicamento de referência. Neste contexto, a questão-chave é até que ponto a experiência existente de um produto original pode ser aproveitada para o desenvolvimento e licenciamento de um produto biossimilar (Schiestl, 2011; Tsiftoglou, Ruiz, e Schneider, 2013).

A confirmação do sucesso de biossimilaridade num produto biossimilar inclui os níveis pré-clínicos e clínicos, incluindo o estudo de fase III. Se estes níveis forem comparativos ao produto de referência, há aprovação do biossimilar em questão. Uma vez que, até as pequenas mudanças de um produto biológico podem alterar a segurança e /ou o perfil de eficácia, os produtos biológicos que não são comparáveis com um produto de referência não são considerados como produtos biológicos similares, mas sim como novas entidades biológicas (Schiestl, 2011).

A extensa comparação estrutural e funcional entre o biossimilar e o produto de referência torna-se a base do desenvolvimento do biossimilar. Um biossimilar deve ser muito semelhante ao produto de referência, no que diz respeito às propriedades físico-químicas e/ou funcionais e à eficácia clínica. Pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas e/ou funcionais ou na eficácia clínica são toleradas, desde que sejam devidamente justificadas por uma maior segurança e farmacocinética e farmacodinâmica melhoradas (Beck et al., 2013).

### 3.3. Situação económica e patentes dos anticorpos monoclonais e biossimilares

Em 1972, as técnicas de produção *in vitro* eram caras, tecnicamente difíceis de produzir e com baixos rendimentos, ou seja, haviam poucos anticorpos viáveis (Peterson, 1972).

Muitas proteínas terapêuticas, mais concretamente os anticorpos monoclonais e os seus componentes (proteínas de fusão e fragmentos), têm sido aprovados nos Estados Unidos da América, Europa e Japão nos últimos 20 anos. Os anticorpos monoclonais tornaram-se no sector na indústria farmacêutica com o maior crescimento de todos os tempos (Dostalek et al., 2013).

O maior número de anticorpos aprovados está destinado ao cancro e a doenças auto-imunes. A melhoria da tecnologia da *phage display* permitiu criar e projectar anticorpos humanizados e totalmente humanos credíveis e confiáveis. Em 2010, os gastos de anticorpos monoclonais para tratamentos excedeu os 32 mil milhões de euros e provavelmente atingirão 56 mil milhões em 2015 (Chon e Zarbis-Papastoitsis, 2011).

O Humira, (o primeiro anticorpo totalmente humano comercializado) autorizado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2002 tem vendas anuais, que atingiram, depois de 2009, valores acima dos 4 mil milhões de euros.

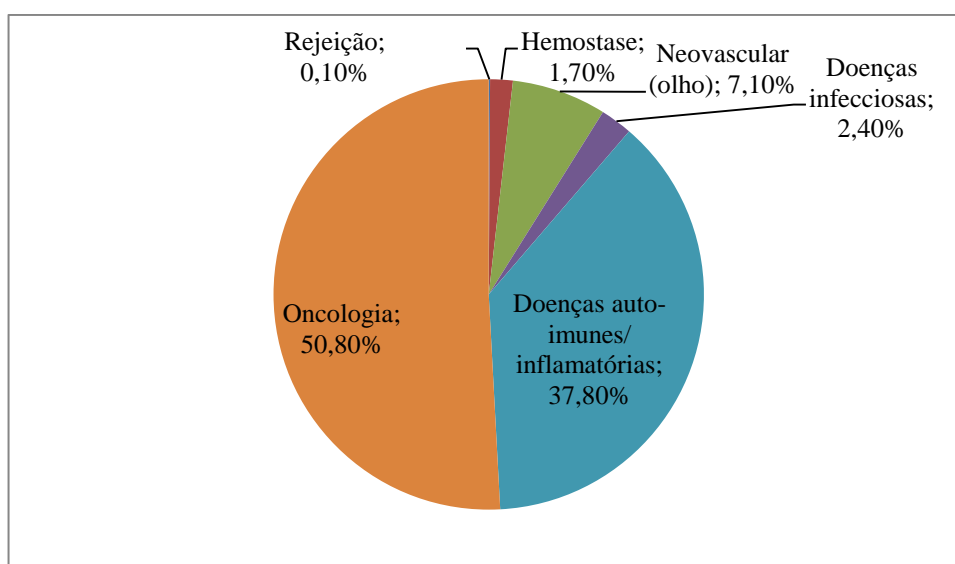


Figura 10 – Percentagens das vendas de anticorpos monoclonais, em cada área, em 2010.  
Adaptado de (Elvin et al., 2013)

As encomendas de patentes relativas aos anticorpos tiveram um grande crescimento nos últimos 20 anos.

Os biofármacos (abrangendo os anticorpos monoclonais) excedem todos os outros ramos da indústria farmacêutica. Os produtos de maior êxito são: Avastin, Erbitux, Herceptin, Humira, Remicade e Rituxan (Butler e Meneses–Acosta, 2012; Elvin et al., 2013; Ribatti, 2014).

Muitos dos fármacos, dentro de pouco tempo, irão perder a patente, pelo que algumas empresas estão a apresentar biossimilares, que são muito mais difíceis de criar que os genéricos, propriamente ditos, de substâncias de síntese química (Beck et al., 2013).

Em 2010, a *European Medicines Agency (EMA)* comunicou uma iniciativa sobre medicamentos similares contendo *mAbs*, lançando uma directiva sobre os estudos médicos e não médicos, que são aconselhados para determinar a analogia e a confiança de um biossimilar equiparado a um produto de referência. A última versão foi divulgada no final de 2012 (Beck et al., 2013).

Nas atribuições da comissão dos medicamentos para uso humano, foram introduzidas as proteínas de fusão *Fc-IgG1* e as disposições sobre os *mAbs* e biossimilares estão, actualmente, a ser debatidas (Beck et al., 2013).

Foram homologados mais de quarenta medicamentos, de *mAbs* e produtos semelhantes, o que revela serem um grupo de mais acelerado desenvolvimento na indústria farmacêutica. O termo de patente de *mAbs* de primeira geração, nos Estados Unidos da América e na União Europeia, como adalimumab, bevacizumab, cetuximab, etanercept, inflixumab, rituximab e trastuzumab, conduziu ao aumento de muitas imitações. Têm sido feitas análises clínicas para ajuizar a sua biossimilariedade com as versões originais.

Confirma-se que a decisão clínica do uso dos biofármacos têm sido boa, pelo que tem dado ocasião a novos empresários da indústria farmacêutica incrementem cópias de biossimilares ou biológicos de segunda geração que foram melhorados para alcançarem melhores desempenhos, já que muitas patentes de primeira geração estão prestes ou já expiraram (Tsiftoglou et al., 2013).

Foram registadas patentes que abarcam os produtos para tratamentos essenciais, bem como tecnologias de programa para criação de anticorpos. É importante para as sociedades

empresariais, que fabricam produtos terapêuticos perceberem que a alteração que sofrem com a perda de patentes possa ser atenuada com a autonomia (que já têm) para aplicar tecnologias de anticorpos para gerar novos produtos.

O patrocínio e a garantia do produto protegem a perda de patente, pois a empresa tem o direito único de o vender no mercado. Alguns exemplos são: Rituxan, Remicade e Avastin com prazos de expiração da patente 2016, 2018 e 2019, respectivamente (Tabela 2)(Petering, McManamny, e Honeyman, 2011).

Tabela 2 – Produtos biofarmacêuticos de referência com patentes a expirar.  
Adaptado de (Tsiftoglou et al., 2013)

Ano	Produtos com a patente a expirar
2014	NovoLog
2015	<u>Herceptin</u> , Lantus, Neulasta, PegIntron, <u>Synagis</u>
2016	Aranesp, <u>Humira</u> , <u>Rituxan</u> ,
2018	<u>Remicade</u>
2019	<u>Avastin</u> , Pegasys

Nota: Os nomes comerciais sublinhados são anticorpos monoclonais.

Existe a previsão da exigência de diminuir o custo de produção dos anticorpos monoclonais, para tratamentos e diagnósticos através da melhoria dos processos de fabrico, porque a procura não pára de crescer. Em relatórios de pesquisa, estima-se que a quota de anticorpos modificados seja superior a 50%. Estes *mAbs* estão entre as terapias mais dispendiosas, especialmente, pelo seu uso em doenças crónicas (Jain e Kumar, 2008).

A realização de um processo altamente produtivo e económico é o grande desafio biotecnológico (Rodrigues et al., 2009).

### 3.4. Anticorpos monoclonais em Portugal

A investigação de anticorpos monoclonais está em desenvolvimento em Portugal.

São muitos os investigadores portugueses que se dedicam à pesquisa e trabalho sobre os anticorpos monoclonais, os fragmentos de anticorpos e os seus métodos de produção.

Um exemplo é o projecto científico Aspire apresentado pela equipa de investigadores: Marta Vaz Mendes; Rita Rocha e Ricardo Vieira-Pires. O projecto investiga um produto de natureza proteica, o RCKlear, que permite remover os contaminantes indesejados resultantes do processo *downstream*. Este projecto apresenta a vantagem de reduzir os custos totais em 5% da produção

([www.actbycotec.com/pt/portfolio.78/projectos.114/cohitec.125/aspire.a452.html](http://www.actbycotec.com/pt/portfolio.78/projectos.114/cohitec.125/aspire.a452.html)).

Outro projecto científico que se encontra em desenvolvimento é a pesquisa e produção de “Anticorpos trifuncionais e tecnologias baseadas em células dendríticas: uma abordagem combinada à imunoterapia para o cancro”, pela equipa liderada pela investigadora Paula Videira. Este projecto destacou-se com o prémio de inovação Bluepharma/Universidade de Coimbra em 2013 (Portugal Cotec, 2014).

Existem também empresas como a Biotecnol e a Technophage que produzem anticorpos.

A Biotecnol é uma empresa de biotecnologia que para além de estar em Portugal, está também nos Estados Unidos da América e tem parcerias com outras empresas europeias e americanas. Esta empresa de biotecnologia desenvolve e produz anticorpos monoclonais humanos, especialmente para área da oncologia. Um anticorpo desenvolvido pela Biotecnol, juntamente com a Universidade de Nápoles, é o anticorpo CAB051 que é utilizado no tratamento do cancro da mama metastático, combinado com um agente citotóxico. A empresa está também a desenvolver um *mAb* “*miniaturized*”, que é um “compactado” do CAB051, 100kDa anti HER2-anticorpo na pesquisa pré-clínica (Portugal Cotec, 2005, 2008).

A Technophage aposta em vários ramos. Neste caso, os de maior importância são os *technoantibodies*. Este ramo trabalha mais concretamente os *small domain antibodies*. A Technophage fez parcerias, uma delas com a empresa Lonza, uma empresa multinacional de biotecnologia suíça, com o objectivo de acelerar o processo de desenvolvimento e consequentemente, a entrada no mercado (Technophage, 2008)

## 4. Produção de anticorpos monoclonais – Futuro

Ao longo dos anos têm sido feitos avanços no design dos *mAbs*, para melhorar a sua eficácia terapêutica, através de uma melhor biodisponibilidade, maior afinidade, aperfeiçoamento nas ligações específicas e anticorpos totalmente humanos para diminuir os efeitos da imunogenicidade.

Nos últimos anos, as empresas têm-se focado, maioritariamente, em dois aspectos: melhorar o design dos *mAbs* e aperfeiçoar o seu processo de produção; e na indústria dos biossimilares aproveitando as patentes que vão expirando.

Os principais incentivos para desenvolver biossimilares são idênticos aos incentivos dos genéricos. Isto significa, promover a concorrência no mercado, preços acessíveis, manter os incentivos para tecnologias de inovação, entre outros (Tsiftoglou et al., 2013).

O estudo sistemático da técnica de criação de anticorpos evolui depressa.

Observa-se que a cultura de células persiste em crescer expressivamente e a aptidão do método de purificação e duração do conjunto de operações realizadas permanece a progredir.

### 4.1. Produção

Há vários pontos que futuramente terão de ser melhorados, e são:

- (1) Processo *upstream*;
- (2) Processo *downstream*;
- (3) Sistemas de produção alternativos;
- (4) Biossimilares.

Quanto ao primeiro ponto têm sido implementados novos conceitos para melhorar as condições das culturas de células mamíferas, visto já se terem distinguido. Muitas empresas têm tentado (e algumas com sucesso) melhorar os biorreactores, com o objectivo de atingir custos inferiores. Todavia esta não é a melhor solução, dado que é necessário investir relativamente às condições nas culturas de células mamíferas.

No segundo ponto a grande atracção é baixar os custos da purificação, ou seja, já se mostrou que a cromatografia por afinidade com a proteína A é a ideal. Porém, os custos desta técnica não são os mais apelativos, por isso, há uma grande motivação para evoluir para novas técnicas.

Com o passar dos anos, os *mAbs* foram ganhando protagonismo, por isso, têm sido criados sistemas de produção alternativos. Primeiro começou com o hibridoma, depois com o rato transgénico, a seguir as *display technologies*, e agora estão a ser utilizadas plantas para a produção de anticorpos. A planta que teve mais sucesso, tanto quanto se sabe, foi o milho. O milho é um forte candidato para a produção de proteínas recombinantes, devido à tecnologia já bem estabelecida na transferência e expressão de genes. O grande desafio, em ter plantas como produtores de anticorpos monoclonais recombinantes, é a sua própria purificação e é isso que tem causado, ao mesmo tempo, entraves neste sistema de produção alternativo. Todavia não deixa de ser uma aposta interessante (Maltezos et al., 2014).

Tendo já como dado adquirido, as plantas surgiram como novo sistema de produção de anticorpos monoclonais. No entanto não evoluíram como pretendido devido ao método de purificação. Até à data ainda não foi encontrado o método excelente para purificar os anticorpos provenientes das plantas.

## **4.2. Biossimilares**

O custo dos tratamentos que utilizam biossimilares tem reduzido, em alguns locais do mundo, a despesa associada a medicamentos.

Há um conjunto de perguntas que deveriam ser respondidas num futuro próximo, tais como (Tsiftoglou et al., 2013):

- Um biossimilar pode ser superior em qualidade em relação ao seu produto de referência?
- O conceito de biossimilidade é adaptável a outras substâncias produzidas biologicamente mais complicadas?
- A produção dos biossimilares pode ser em hospedeiros distintos?
- Os biossimilares tendo custos mais acessíveis na sua produção, sendo mais baratos, podem afectar, os custos dos tratamentos com os produtos de referência?



As questões levantadas, são algumas entre outras, das mais pertinentes e que necessitam de resolução.

### 4.3. Futuros anticorpos monoclonais

Existem anticorpos monoclonais em fase de ensaios clínicos, sendo estes, quando aprovados pela *FDA* os novos anticorpos monoclonais.

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais humanizados.

Adaptado de <http://www.immunologylink.com/namesfoMABS.html>

Anticorpos monoclonais humanizados (–zumab)		
Utilização clínica	Nomenclatura – utilização clínica juntamente com o tipo de anticorpo monoclonal	Exemplos
Tumor	"–tuzu–"	Afutuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab, Bivatuzumab mertansine, Cantuzumab mertansine, Citatuzumab bogatox, Dacetuzumab, Elotuzumab, Etaracizumab, Farletuzumab, Gemtuzumab ozogamicin, Inotuzumab ozogamicin, Labetuzumab, Lintuzumab, Matuzumab, Milatuzumab, Nimotuzumab, Oportuzumab monatox, Pertuzumab, Sibrotuzumab, Tacatuzumab tetraxetan, Tigatuzumab, Trastuzumab, Tucotuzumab celmoleukin, Veltuzumab
Sistema Imunitário	"–lizu–"	<b>Imunosupressores:</b> Aselizumab, Apolizumab, Benralizumab, Cedelizumab, Certolizumab pegol, Daclizumab, Eculizumab, Efalizumab, Epratuzumab, Erlizumab, Fontolizumab, Mepolizumab, Natalizumab, Ocrelizumab, Omalizumab, Pascolizumab, Pexelizumab, PRO 140, Reslizumab, Rontalizumab, Rovelizumab, Ruplizumab, Siplizumab, Talizumab, Teplizumab, Tocilizumab, Toralizumab, Vedolizumab, Visilizumab, TGN1412
		<b>Não–imunosupressores:</b> Ibalizumab
Bactérias	"–bazu–"	Tefibazumab
Cardiovascular	"–cizu–"	Alacizumab pegol, Bevacizumab/Ranibizumab, Etaracizumab, Tadocizumab
Sistema nervoso	"–nezu–"	Bapineuzumab, Solanezumab, Tanezumab
	"–neuzu–"	
Toxinas como alvo	"–toxazu–"	Urtioxazumab

Anticorpos monoclonais humanizados (–zumab)		
Viral	"–vizu–"	Felvizumab, Motavizumab, Palivizumab
Inerleucinas	"–kizu–"	Lebrikizumab
Angiogénese	"–anibizu–"	Ranibizumab

Tabela 4 – Anticorpos monoclonais humanos.

Adaptado de <http://www.immunologylink.com/namesfoMABS.html>

Anticorpos monoclonais humanos ("–u–")		
Utilização clínica	Nomenclatura – utilização clínica juntamente com o tipo de anticorpo monoclonal	Exemplos
Tumor	"–tumu–"/	Adecatumumab, Belimumab, Cixutumumab, Conatumumab, Figitumumab, Iratumumab, Lexatumumab, Lucatumumab, Mapatumumab, Necitumumab, Ofatumumab, Olaratumab, Panitumumab, Pritumumab, Robatumumab, Votumumab, Zalutumumab
	"–tu–"	
Sistema Imunitário	"–limu–"	<b>Imunossupresores:</b> Adalimumab, Atorolimumab, Fresolimumab, Golimumab, Lerdelimumab, Metelimumab, Morolimumab immune
		<b>Activadores:</b> Ipilimumab, Tremelimumab
		<b>Outros:</b> Bertilimumab, Zanolimumab
Bacterial	"–bacu–"	Nebacumab, Panobacumab, Raxibacumab
Ossos	"–osu–"	Denosumab
Sistema nervoso	"–neru–"	Gantenerumab
Músculo–esquelético	"–mulu–"	Stamulumab
Viral	"–viru–"	Exbivirumab, Foravirumab, Libivirumab, Rafivirumab, Regavirumab, Sevirumab, Tuvirumab
Inerleucinas	"–kinu–"	Briakinumab, Canakinumab, Ustekinumab
Fungos	"–fungu–"	Efungumab
Cardiovascular	"–ciru–"	Ramucirumab

## 5. Conclusões

Os anticorpos monoclonais são moléculas terapêuticas e, actualmente, estão em grande desenvolvimento. Os *mAbs* têm várias aplicações, sendo que, as que têm um maior destaque são o diagnóstico e a terapêutica. Assim, os *mAbs* podem ser usados em áreas distintas da medicina, desde tumores até doenças infecciosas.

A técnica do hibridoma foi a primeira técnica de produção de anticorpos monoclonais, e permitiu a sua produção em larga escala. No entanto, esta técnica evoluiu e, actualmente, existem quatro tipos de anticorpos monoclonais e cada um com uma nomenclatura: *mAbs* murinos (–omab); *mAbs* quiméricos (–ximab); *mAbs* humanizados (–zumab) e *mAbs* humanos (–umab).

Depois da técnica do hibridoma, houve um grande avanço na engenharia celular, e surgiram, então, as *display technologies*. Estas *display technologies* englobam:

- *Phage display*, a primeira técnica que criou um fago que tem o gene que codifica para anticorpos expressando-os na sua superfície;
- *Ribosome display* que selecciona, *in vitro*, péptidos e proteínas, e que permite a maturação da afinidade dos anticorpos e a criação de bibliotecas;
- *Cell display* que trabalhou, até agora, três tipos de células, a *bacterial surface display*, *yeast display* e *mammalian cell display*.

Para além das técnicas, as *display technologies* também criaram e desenvolveram bibliotecas. Actualmente, existem as bibliotecas imunes, as bibliotecas naïve, as bibliotecas semi-sintéticas e as bibliotecas sintéticas.

Por fim, foi criada a técnica do rato transgénico, e que permitiu a produção de *mAbs* humanos. Esta técnica de produção de anticorpos monoclonais foi a que menos causou alergias ou reacções imunogénicas, depois de administrada aos doentes.

Os anticorpos monoclonais obtidos pelas diferentes técnicas, são depois submetidos a processos de congelamento e são armazenados em bancos de células.

A produção de anticorpos monoclonais, propriamente dita, para além das técnicas acima referidas, engloba também a) as culturas de células e/ou linhas celulares, sendo a mais

utilizada a CHO (*Chinese Hamster Ovary*); b) os sistemas de produção: a cultura aderente e a cultura suspensa, sendo a cultura suspensa a mais utilizada pela indústria; c) os métodos de operação: *batch*, *fed-batch* e sistema de cultura de perfusão contínua, sendo o segundo e o terceiro método os mais utilizados na indústria; d) os processos de monitorização: temperatura; pH; osmolaridade; oxigénio dissolvido, dióxido de carbono; concentração dos nutrientes e dos metabolitos; glicosilação entre outros; e) o processo *upstream*, que envolve o processo de inoculação; f) a fase intermédia que é o processo de fermentação/produção de células; e g) o processo *downstream*, que é a purificação dos anticorpos monoclonais através de técnicas de cromatografia, sendo a cromatografia por afinidade com a proteína A, a mais comum e utilizada.

A maior despesa na produção de anticorpos monoclonais é o processo *downstream*, a purificação, que utiliza a técnica da cromatografia por afinidade com a proteína A. Esta técnica é muito dispendiosa, reflectindo-se no preço do anticorpo monoclonal. O facto de esta técnica ser cara levou à procura de novas técnicas de produção mais acessíveis como a cromatografia por troca de catiões (CEX).

Depois das três grandes técnicas de produção de anticorpos monoclonais, a engenharia celular focou-se em como melhorar as técnicas, a fim de aumentar a produtividade e/ou modificar as características dos *mAbs*, através de, por exemplo, sistemas de expressão e processos de transcrição. A engenharia celular desenvolveu também os fragmentos de anticorpos, como os *Fabs*, os *scFv* e *single domains*. Estas moléculas terapêuticas são muito importantes na área da imunoterapia, pois têm um peso molecular baixo, o que lhes permite penetrar mais facilmente no alvo terapêutico, além de se poderem fundir com outras moléculas, conduzindo-as às células alvo.

Os anticorpos monoclonais foram criados com o intuito de tratar doenças, inicialmente no tratamento de transplante de órgãos, nas doenças auto-imunes e no cancro. Mais tarde, os *mAbs* expandiram-se para outras áreas da medicina como, por exemplo, para as doenças cardiovasculares.

Os biossimilares são biomedicamentos semelhantes a outros biomedicamentos já existentes, ou seja, em termos gerais, um biossimilar é um genérico. Todos os anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpos criados e aprovados pela *FDA*, estão obviamente patenteados. Uma vez que a primeira geração de biomedicamentos perdeu a patente, muitas empresas têm apostado na produção em larga escala de anticorpos monoclonais biossimilares.

Para um biossimilar ser aprovado é necessário ser provada a sua biossimilaridade, a níveis pré-clínicos e clínicos na fase III dos ensaios clínicos. Isto significa que um biossimilar tem a farmacocinética e a farmacodinâmica semelhantes ao produto de referência.

Devido à enorme procura de anticorpos monoclonais, a indústria tem de apostar em melhorar e desenvolver novas práticas no processo *upstream* e *downstream*, na engenharia celular e em sistemas de produção alternativos e nos biossimilares, que fazem com que haja concorrência no mercado e que existam preços mais acessíveis.

Conclui-se, assim, que a indústria farmacêutica e a biotecnologia irão continuar a investir fortemente nos anticorpos monoclonais.



## 6. Bibliografia

- Adams, J. J., e Sidhu, S. S. (2014). Synthetic antibody technologies. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 1–9. doi:10.1016/j.sbi.2013.11.003
- Aires da Silva, F., Corte-Real, S., e Goncalves, J. (2008). Recombinant antibodies as therapeutic agents: pathways for modeling new biodrugs. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 22(5), 301–14.
- Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., e O’Kennedy, R. (2012). Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods (San Diego, Calif.)*, 56(2), 116–29. doi:10.1016/j.ymeth.2011.10.007
- Bai, L., Burman, S., e Gledhill, L. (2000). Development of ion exchange chromatography methods for monoclonal antibodies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(3), 605–11.
- Barbosa, M. D. F. S., Kumar, S., Loughrey, H., e Singh, S. K. (2012). Biosimilars and biobetters as tools for understanding and mitigating the immunogenicity of biotherapeutics. *Drug Discovery Today*, 17(23–24), 1282–8. doi:10.1016/j.drudis.2012.07.003
- Beck, A., Diemer, H., Ayoub, D., Debaene, F., Wagner-Rousset, E., Carapito, C., ... Sanglier-Cianférani, S. (2013). Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 48, 81–95. doi:10.1016/j.trac.2013.02.014
- Birch, J. R., e Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5–6), 671–85. doi:10.1016/j.addr.2005.12.006
- Boder, E. T., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., e Price, J. V. (2012). Engineering antibodies by yeast display. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 99–106. doi:10.1016/j.abb.2012.03.009
- Bonanno, J. B., Burley, S. K., Sowell, J., Stevens, J. F., Ho, M., Nagata, S., e Pastan, I. (2007). Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells, 104(36).
- Butler, M., e Meneses-Acosta, a. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 885–94. doi:10.1007/s00253-012-4451-z
- Canziani, G. a, Klakamp, S., e Myszka, D. G. (2004). Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore. *Analytical Biochemistry*, 325(2), 301–307. doi:10.1016/j.ab.2003.11.004

- Cervino, C., Weber, E., Knopp, D., e Niessner, R. (2008). Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 329(1–2), 184–93. doi:10.1016/j.jim.2007.10.010
- Chon, J. H., e Zarbis-Papastoitis, G. (2011). Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New Biotechnology*, 28(5), 458–63. doi:10.1016/j.nbt.2011.03.015
- Doerner, A., Rhiel, L., Zielonka, S., e Kolmar, H. (2014). Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening. *FEBS Letters*, 588(2), 278–87. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.025
- Dos Santos, R., Rosa, S. a S. L., Aires-Barros, M. R., Tover, A., e Azevedo, A. M. (2014). Phenylboronic acid as a multi-modal ligand for the capture of monoclonal antibodies: development and optimization of a washing step. *Journal of Chromatography. A*, 1355, 115–24. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.001
- Dostalek, M., Gardner, I., Gurbaxani, B. M., Rose, R. H., e Chetty, M. (2013). *Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. Clinical pharmacokinetics* (Vol. 52, pp. 83–124). doi:10.1007/s40262-012-0027-4
- Elvin, J. G., Couston, R. G., e van der Walle, C. F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *International Journal of Pharmaceutics*, 440(1), 83–98. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.039
- Falkenberg, F. W. (1998). Monoclonal antibody production: problems and solutions. *Research in Immunology*, 149(6), 542–7.
- Gagnon, P. (2012). Technology trends in antibody purification. *Journal of Chromatography. A*, 1221, 57–70. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.034
- Green, L. L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 231(1–2), 11–23.
- Hairul Bahara, N. H., Tye, G. J., Choong, Y. S., Ong, E. B. B., Ismail, A., e Lim, T. S. (2013). Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization*, 41(4), 209–16. doi:10.1016/j.biologicals.2013.04.001
- Harel Inbar, N., e Benhar, I. (2012). Selection of antibodies from synthetic antibody libraries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 87–98. doi:10.1016/j.abb.2011.12.028



- Harman, B. C., Giles–Komar, J., e Rycyzyn, M. a. (2014). Antibody discovery from immune competent and immune transplanted mice. *Current Drug Discovery Technologies*, 11(1), 65–73.
- Ho, S. V, McLaughlin, J. M., Cue, B. W., e Dunn, P. J. (2010). Environmental considerations in biologics manufacturing, 755–766. doi:10.1039/b927443j
- [Http://course1.winona.edu/kbates/Immunology/chapter4-09.htm](http://course1.winona.edu/kbates/Immunology/chapter4-09.htm). (n.d.). Chapter 4 Antibody Structure and the Generation of B–Cell Diversity.
- Jain, E., e Kumar, A. (2008). Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnology Advances*, 26(1), 46–72. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.09.004
- Kellermann, S. A., e Green, L. L. (2002). Antibody discovery: the use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 593–7.
- Kyriakopoulos, S., e Kontoravdi, C. (2012). Analysis of the landscape of biologically–derived pharmaceuticals in Europe: Dominant production systems, molecule types on the rise and approval trends. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 428–441. doi:10.1016/j.ejps.2012.11.016
- Lee, S.–Y., Kwon, Y.–B., Cho, J.–M., Park, K.–H., Chang, S.–J., e Kim, D.–I. (2012). Effect of process change from perfusion to fed–batch on product comparability for biosimilar monoclonal antibody. *Process Biochemistry*, 47(9), 1411–1418. doi:10.1016/j.procbio.2012.05.017
- Ling, W. L. W., Deng, L., Lepore, J., Cutler, C., Cannon–Carlson, S., Wang, Y., e Voloch, M. (2003). Improvement of monoclonal antibody production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biotechnology Progress*, 19(1), 158–62. doi:10.1021/bp020068d
- Malpiedi, L. P., Díaz, C. a., Nerli, B. B., e Pessoa, A. (2013). Single–chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochemistry*, 48(8), 1242–1251. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.008
- Maltezos, A., Platis, D., Vlachakis, D., Kossida, S., Marinou, M., e Labrou, N. E. (2014). Design, synthesis and application of benzyl–sulfonate biomimetic affinity adsorbents for monoclonal antibody purification from transgenic corn. *Journal of Molecular Recognition : JMR*, 27(1), 19–31. doi:10.1002/jmr.2327
- Marx, U. (1998). Membrane–based cell culture technologies: a scientifically and economically satisfactory alternative to malignant ascites production for monoclonal antibodies. *Research in Immunology*, 149(6), 557–9.

- Mesci, A., e Carlyle, J. R. (2007). A rapid and efficient method for the generation and screening of monoclonal antibodies specific for cell surface antigens. *Journal of Immunological Methods*, 323(1), 78–87. doi:10.1016/j.jim.2007.02.007
- Miersch, S., e Sidhu, S. S. (2012). Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations. *Methods (San Diego, Calif.)*, 57(4), 486–98. doi:10.1016/j.ymeth.2012.06.012
- Nissim, a, e Chernajovsky, Y. (2008). Historical development of monoclonal antibody therapeutics. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (181), 3–18. doi:10.1007/978-3-540-73259-4\_1
- Petering, J., McManamny, P., e Honeyman, J. (2011). Antibody therapeutics – the evolving patent landscape. *New Biotechnology*, 28(5), 538–44. doi:10.1016/j.nbt.2011.03.023
- Peterson, N. C. (1972). Considerations for irt vitro monoclonal. *Of, Vivovitro Production July, Hybridoma Received*.
- Portugal Cotec. (2005). Biotecnol SA publica resultados de eficácia in-vivo do seu anticorpo humano anti-HER2 (CAB051). [http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=148&Itemid=319](http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=148&Itemid=319)
- Portugal Cotec. (2008). BIOTECNOL – SERVIÇOS E DESENVOLVIMENTO, SA. [http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=241](http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=241)
- Portugal Cotec. (2014). Projecto da Universidade Nova de imunoterapia para o cancro vence Prémio Inovação Bluepharma/Universidade de Coimbra. [http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=2637&Itemid=318](http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=2637&Itemid=318)
- Rasmussen, S. K., Næsted, H., Müller, C., Tolstrup, A. B., & Frandsen, T. P. (2012). Recombinant antibody mixtures: production strategies and cost considerations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 139–45. doi:10.1016/j.abb.2012.07.001
- Ravn, U., Didelot, G., Venet, S., Ng, K.-T., Gueneau, F., Rousseau, F., ... Fischer, N. (2013). Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery. *Methods (San Diego, Calif.)*, 60(1), 99–110. doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.001
- Ribatti, D. (2014). From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. *Immunology Letters*, 161(1), 96–9. doi:10.1016/j.imlet.2014.05.010
- Rita Costa, a, Elisa Rodrigues, M., Henriques, M., Azeredo, J., e Oliveira, R. (2010). Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of*

*Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 74(2), 127–38. doi:10.1016/j.ejpb.2009.10.002

Rodrigues, M. E., Costa, A. R., Henriques, M., Azeredo, J., e Oliveira, R. (2009). Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnology Progress*, 26(2), 332–51. doi:10.1002/btpr.348

Schiestl, M. (2011). A biosimilar industry view on the implementation of the WHO guidelines on evaluating similar biotherapeutic products. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization*, 39(5), 297–9. doi:10.1016/j.biologicals.2011.06.014

Shukla, A. a, e Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 253–61. doi:10.1016/j.tibtech.2010.02.001

Technophage. (2008). DOMAIN ANTIBODIES DOMAIN. [http://www.technophage.pt/pdf/FlyerTechnoPhage\\_SmallDomainAntibodiesPlatform.pdf](http://www.technophage.pt/pdf/FlyerTechnoPhage_SmallDomainAntibodiesPlatform.pdf)

Tsiftoglou, A. S., Ruiz, S., e Schneider, C. K. (2013). Development and regulation of biosimilars: current status and future challenges. *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceutics and Gene Therapy*, 27(3), 203–11. doi:10.1007/s40259-013-0020-y

[www.actbycotec.com/pt/portfolio.78/projectos.114/cohitec.125/aspire.a452.html](http://www.actbycotec.com/pt/portfolio.78/projectos.114/cohitec.125/aspire.a452.html).

[www.biomedicinapadrao.com/www.bio.davidson.edu..](http://www.biomedicinapadrao.com/www.bio.davidson.edu..)

[www.genmab.com/about-us](http://www.genmab.com/about-us).

[www.genmab.com/partnering/licensing-opportunities/technology](http://www.genmab.com/partnering/licensing-opportunities/technology)

[www.immunologylink.com/FDA-APP-Abs.html](http://www.immunologylink.com/FDA-APP-Abs.html).

Zhou, H., Zhang, Y.-L., Lu, G., Ji, H., e Rodi, C. P. (2011). Recombinant antibody libraries and selection technologies. *New Biotechnology*, 28(5), 448–52. doi:10.1016/j.nbt.2011.03.013

Zhou, J. X., Tressel, T., Yang, X., e Seewoester, T. (2008). Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production. *Biotechnology Journal*, 3(9–10), 1185–200. doi:10.1002/biot.200800117

